



**UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ**

**FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

MARIA KLAYRE ARAÚJO DE SOUSA

**INTEGRIDADE DA MUCOSA DUODENAL DE CAMUNDONGOS: EFEITOS
DE ESTÍMULOS (ACIDEZ, PEPSINA E SAIS BILIARES) E DE AGENTES
PROTETORES TÓPICOS**

FORTALEZA – CEARÁ

2022

MARIA KLAYRE ARAÚJO DE SOUSA

**INTEGRIDADE DA MUCOSA DUODENAL DE CAMUNDONGOS: EFEITOS DE
ESTÍMULOS (ACIDEZ, PEPSINA E SAIS BILIARES) E DE AGENTES
PROTETORES TÓPICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola
Ponte de Souza

Coorientadora: Dra. Suliana Mesquita Paula

FORTALEZA – CEARÁ

2022

MARIA KLAYRE ARAÚJO DE SOUSA

**INTEGRIDADE DA MUCOSA DUODENAL DE CAMUNDONGOS: EFEITOS
DE ESTÍMULOS (ACIDEZ, PEPSINA E SAIS BILIARES) E DE AGENTES
PROTETORES TÓPICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em farmacologia.

Aprovada em: 13/04/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza

(Orientador)

Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Armênio Aguiar Dos Santos

Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Lucas Antonio Duarte Nicolau

Universidade Federal do Delta do Parnaíba

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S697i Sousa, Maria Klayre Araújo de.
Integridade da mucosa duodenal de camundongos: efeitos de estímulos (acidez, pepsina e sais biliares) e de agentes protetores tópicos / Maria Klayre Araújo de Sousa. – 2022.
73 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza.

Coorientação: Profa. Dra. Suliana Mesquita Paula.

1. Duodeno. 2. Acidez. 3. Sal biliar. 4. Dispepsia. I. Título.

CDD 615.1

DEDICATÓRIA

A Deus.

Aos meus pais, Valdirene e Dorgival.

AGRADECIMENTO

À Instituição FUNCAP, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Prof. Dr. **Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza**, pela excelente orientação, pela confiança depositada, por ter me dado o privilégio de poder aprender mais sobre pesquisa, ciência e por ter tido tanta paciência. Só sei ser grata por ter me amparado e me guiado me trazendo para realidade ao me mostrar o que é certo e melhor para mim.

À minha coorientadora Dra. **Suliana Mesquita Paula**, uma mulher incrível e exemplar a quem agradeço por tanto auxílio no percorrer do mestrado, um exemplo de educadora que me acompanhou integralmente. Só tenho a agradecer por cada aprendizado e por tamanha bondade e amparo.

Ao Me. **Thiago Meneses Araújo Leite Sales** e à Dra. **Priscilla Fernanda Campos Justino**, por terem me inserido na pesquisa desde a iniciação científica, por serem parte importante do que eu sou e por nunca terem desistido de mim. Serei eternamente grata.

Aos professores participantes da banca examinadora de qualificação e defesa **Armênio dos Santos, Lucas Nicolau, Carlos Eduardo, Pedro Soares, Álvaro Xavier, Kaira Emanuella, Samara Damasceno e Priscilla Fernanda** pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Ao aluno de iniciação científica **Thiago Andrade**, pelo perfeccionismo e maturidade, por ter me auxiliado em tantos experimentos e contribuído diretamente com os resultados desse estudo.

À minha dupla de mestrado, **Paulo Roberto**, pelo apoio e auxílio nos experimentos e no dia a dia do laboratório e por cada conhecimento dividido comigo.

Ao **Centro de Biotecnologia e Biodiversidade (BIOTEC) - UFDPAr**, pela parceria na extração e purificação das Gomas do Cajueiro e do Angico.

Ao Prof. Dr. **Pedro Marcos Gomes Soares**, por sua liderança no LEFFAG e considerações científicas sempre que solicitadas.

Ao Prof. Dr. **Armênio Santos Aguiar**, por ter aberto as portas do seu laboratório e por sempre ter me recebido com muito carinho, para que pudesse desenvolver a pesquisa nos momentos em que necessitei de usufruir de seu laboratório.

À minha mãe, **Valdirene Moreno Araújo**, que tanto luta pelo alcance dos meus objetivos, me dando suporte e fazendo de tudo por mim. Aos meus avós, exemplo de luta e determinação. À minha família, ao meu pai, **Dorgival Coelho de Sousa**. Aos meus irmãos, **José Luiz e Anthony**, e à minha irmã, **Maria Nathalya Araújo Sousa**, minha maior força para viver. Ao meu companheiro **João Pedro** e minha filha pet **Kiara**.

Aos amigos da vida, do laboratório e de mestrado, **Géssica, Maria, Renata, Quésia, Levi, Lara, Humberto, Bela, Gerardo, Mona, João Pedro, Álvaro e Carlos** pelos experimentos e cafés compartilhados, pelos momentos, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

Ao professor **Roberto César**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e às meninas responsáveis pela secretaria do departamento **Laura e Milena**, pela excelência ao sempre me auxiliar, paciência e toda a dedicação em se esforçar para ajudar nos trâmites burocráticos.

“Aut viam inveniam aut faciam”

“Ou descubro o caminho, ou então o farei.”

- Aníbal Barca.

RESUMO

INTEGRIDADE DA MUCOSA DUODENAL DE CAMUNDONGOS: EFEITOS DE ESTÍMULOS (ACIDEZ, PEPSINA E SAIS BILIARES) E DE AGENTES PROTETORES TÓPICOS

O trato gastrointestinal (TGI), em seus inúmeros aspectos, tem como principal característica atuação no processo de absorção de nutrientes, além disso, esse sistema desempenha o importante papel na função de barreira contra entrada sistêmica de agentes nocivos. No que diz respeito às condições patológicas, a disfunção da barreira intestinal se encontra associada à Dispepsia Funcional (DF), afetando cerca de 10% até 30% dos indivíduos no mundo e se fazendo presente em torno de 40% da população brasileira. Com relação ao seu ponto originário, dados prévios apontam com cada vez mais frequência que o duodeno se trata de uma região-chave subjacente à fisiopatologia da DF. O presente estudo buscou avaliar o efeito da acidez, pepsina e sais biliares na integridade da mucosa duodenal de camundongos, assim como investigar possíveis efeitos protetores de tratamentos tópicos. Para isso, foram utilizadas biópsias de duodeno de camundongos Swiss machos (20 a 30g e com o N de 6 por grupo). Com a finalidade de avaliar a integridade da mucosa duodenal, foi mensurada a resistência elétrica transepitelial (RETE) em Câmaras de Ussing, analisando a alteração da RETE frente à exposição de soluções de Krebs ácidas (pH 2; pH 1.75; pH 1.5; pH 1.25; pH 1) no epitélio duodenal, vindo a ser avaliado também se o dano encontrado foi permanente em pH de 1.5, observando o tecido em pH de 7.4 por 1 hora após ser submetido à solução acidificada. Foi analisado também o efeito da solução ácida de pH 1.5 em adição de pepsina, sal biliar TDCA (ácido taurodeoxicólico) e GUDCA (ácido glicoursodeoxicólico). Por fim, avaliou-se o efeito protetor tópico dos compostos Goma do Angico (GA), Goma do Cajueiro (GC), Alginato e Sucralfato frente à exposição da solução ácida ao tecido duodenal. Dessa forma, observou-se efeito dependente da acidez na queda da RETE duodenal, sendo crescente à medida que se intensificou a acidez das soluções utilizadas. A exposição prolongada à solução de Krebs acidificada (pH 1.5) não causou dano permanente visto que a RETE duodenal se reestabeleceu quando o tecido foi retomado para seu pH fisiológico. Tanto isolados como em junção, a pepsina e o TDCA não ocasionaram aumento dos danos à integridade que já eram causados pela solução ácida (1.5), assim como também o sal biliar GUDCA não preveniu a queda da RETE duodenal. Em relação aos dados obtidos dos bioprotetores tópicos, observou-se que esses não

conseguiram prevenir a queda da RETE ocasionada pela acidez (1.5) na mucosa duodenal. Portanto, sendo necessários estudos acerca de esclarecer a via da acidez nos danos relacionados ao epitélio duodenal e assim buscar por novos tratamentos direcionados às afecções duodenais relacionadas à DF.

Palavras-chave: Duodeno. Acidez. Sal biliar. Dispepsia Funcional.

ABSTRACT

INTEGRITY OF THE DUODENAL MUCOSA OF MICES: EFFECTS OF STIMULES (ACIDITY, PEPSIN AND BILIARY SALTS) AND TOPICAL PROTECTIVE AGENTS

The gastrointestinal tract (GT), in its relevant aspects, has as its main characteristic the action in the process of nutrient absorption, however, in addition, it has the function of important agents in the barrier against the systemic entry of nutrients. With regard to pathological conditions, intestinal barrier dysfunction is associated with Functional Dyspepsia (FD), affecting from 10% to 30% of general population and being present in around 40% of the Brazilian population. With respect to its point of origin, data increasingly emerges that the duodenum is a key region underlying its pathophysiology. The purpose of the project is to assess possible effect of acid, pepsin and bile salts on the duodenal mucosa present in mice, as well as investigating the protective effect of treatments. For this, duodenal biopsies from male Swiss mice (20 to 30g and with a significant N of 6 per group) were used. In order to evaluate the resistance electrical transepithelial duodenal mucosa was measured the acids (pH 7.4; pH 2; pH 1,75; pH 1,5; pH 1,25; pH 1) in the duodenal epithelium. Was measured also if the damage that was found at pH 1,5 was becoming permanent . The made the analyze too the effect of acid (pH 1.5) with the addition to pepsin, biliary salt TDAC (taurodeoxycholic acid) and GUDAC (Glucoursodeoxycholic Acid). Finally, it evaluated the topical protective effect of the compounds Alginate, Angico Gum (AG), Cashew tree Gum (CTG) and Sucralfate in these changes. Thus, the acid-dependent effect on duodenal RETE was observed, increasing as it intensifies in the fall of the solution of the solutions used. Prolonged exposure to acid (pH 1,5) does not make the harm permanent that's because restores it when tissue pH has been observed to its physiological pH. Both isolated and increased bile acid, as well as pepsin and TDAC with to acid (pH1,5), do not cause damage to bile acid, as well the bile salt, did not prevent duodenal RETE from falling. And finally, the acid in the duodenal mucosa does not prevent the RETE drop with of the recommended bioprotectors occasionally. Therefore, studies are needed to clarify the acid pathway in damage related to the duodenal epithelium and thus search for new treatments aimed at duodenal disorders.

Key words: Duodenum. Acidity. Bile salt. Functional dyspepsia.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância
ASBT – Transportador Apical de Ácido Biliar Dependente de Sódio
BIOTEC – Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade e Biotecnologia
CA – Ácido Cólico
CaCl₂: Cloreto de Cálcio
CDCA – Ácido Quenodesoxicólico
CEUA – Comitê de Ética em Uso de Animais
CO₂: Dióxido de Carbono
DCA – Ácido Deoxicólico
DF – Dispepsia Funcional
DRGE – Doença do Refluxo Gastroesofágico
GA: Goma do Angico
GC – Goma do Cajueiro
GUDCA – Ácido Glicoursodeoxicólico
HCl – Ácido clorídrico
HCO₃ - Bicarbonato
IBPs - Inibidores da Bomba De Prótons
JAs – Junções Aderentes
JAM-A – Molécula de adesão juncional - A
LCA – Ácido Litocólico
LEFFAG: Laboratório de Estudos da FisiFarmacologia Gastrointestinal
NaCl: Cloreto de Sódio
NaHCO₃: Bicarbonato de sódio
O₂: Oxigênio
pKa – Constante de Dissociação Ácida
pH – Potencial de Hidrogênio
RETE – Resistência Elétrica Transepitelial
SDE – Síndrome da dor epigástrica
SDP – Síndrome do desconforto pós-prandial
TDCA – Ácido Taurodeoxicólico
TGI – Trato Gastrointestinal
TJ – Tight Junctions
TRPV1 - Receptor Vanilóide de Potencial Transitório tipo 1
UFC: Universidade Federal do Ceará

VDR - Receptores de Vitamina D

ZO – Zônulas Ocludentes

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Principais fatores envolvidos na Dispepsia Funcional | 3 |
| Figura 2 - Linha cronológica do uso de produtos naturais em patologias que acometem o Trato Gastrointestinal. | 17 |
| Figura 3 - Adaptador da câmara de Ussing com o tecido posicionado exatamente no orifício de 0.017 cm ² (A) e câmara fechada com o tecido posicionado (B). | 22 |
| Figura 4 - Resina extraída do tronco do cajueiro (A e B), Goma do Cajueiro após purificação (C) e representação da sua estrutura química (D)..... | 24 |
| Figura 5 - Angico (<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan var. <i>cebil</i> (Griseb.) Altschul). | 25 |
| Figura 6 - Análise de variação de resistência elétrica transepitelial do duodeno após desafio com soluções ácidas..... | 27 |
| Figura 7 - Análise de dano à resistência elétrica transepitelial do duodeno posterior aos 30 minutos..... | 28 |
| Figura 8 - Efeito da pepsina e TDCA na resistência elétrica transepitelial duodenal em solução de pH 1,5. | 29 |
| Figura 9 – Efeito do GUDCA na resistência elétrica transepitelial duodenal em solução de pH 7,4 e 1,5. | 30 |
| Figura 10 - Efeito da Goma do Cajueiro, Goma do Angico e fármacos na resistência elétrica transepitelial do duodeno exposto à solução de pH 1,5 por 30 minutos. | 31 |
| Figura 11 - Modelo hipotético com base nos achados do estudo. | 41 |

LISTA DE SÍMBOLOS

%: porcentagem

®: Registrado

cm: centímetro

cm²: centímetro quadrado

g: grama

h: Hora(s)

H⁺: ácido

H₂: receptor de Histamina do tipo 2

mg: miligrama

min: minuto(s)

mL: mililitro

mM: milimolar

ms: milissegundo

s: segundo

T₀: tempo inicial

Ωcm²: Ohm por centímetro quadrado

μl: microlitro

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 6 |
| 2.1 Aspectos funcionais do Trato Gastrointestinal: o Duodeno | 6 |
| 2.2 Dispepsia Funcional | 8 |
| 2.3 Agentes envolvidos na dispepsia funcional | 10 |
| 2.3.1 Acidez no epitélio duodenal | 10 |
| 2.3.2 Sais biliares | 12 |
| 2.4 Tratamentos para a Dispepsia Funcional | 14 |
| 2.4.1 Alginato | 14 |
| 2.4.2 Sucralfato | 15 |
| 2.5 Biopolímeros e a proteção epitelial | 16 |
| 3 OBJETIVOS | 19 |
| 3.1 Objetivo Geral | 19 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 19 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 20 |
| 4.1 Drogas, reagentes e outros materiais | 20 |
| 4.2 Animais | 20 |
| 4.3 Aspectos éticos | 20 |
| 4.4 Dissecção duodenal | 21 |
| 4.5 Resistência transepitelial | 21 |
| 4.6 Soluções desafio | 22 |
| 4.7 Extração e Purificação da Goma do Cajueiro | 23 |
| 4.8 Extração e Purificação da Goma do Angico (<i>Anadenanthera sp.</i>) | 24 |
| 4.9 Análise estatística | 26 |
| 5. RESULTADOS | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 5.1 Efeito de diferentes soluções ácidas sobre a queda da RETE no epitélio duodenal | 27 |
| 5.2 Avaliação de reestabelecimento da RETE do duodeno por 1h em pH 7.4 posterior aos 30 min de exposição a solução desafio | 28 |
| 5.3 Efeitos da pepsina e TDCA em associação à solução acidificada | 29 |
| 5.4 Efeito do GUDCA na RETE duodenal e em junção à solução acidificada | 30 |
| 5.5 Efeitos dos compostos tópicos na diminuição da RETE duodenal exposta à solução de pH 1.5 | 31 |
| 6. DISCUSSÃO | 32 |
| 7. CONCLUSÃO | 40 |
| REFERÊNCIAS | 42 |
| ANEXOS | 56 |

1. INTRODUÇÃO

O Trato Gastrointestinal (TGI) em seus inúmeros aspectos tem como principal característica a atuação no processo de absorção de nutrientes, além disso, esse sistema desempenha o importante papel na função de barreira contra entrada sistêmica de agentes nocivos, sejam microrganismos ou antígenos provenientes da alimentação (MATHEUS, 2016). O mecanismo do sistema de barreira intestinal depende da interação de vários componentes, estando inclusos o gel mucoso adesivo, a imunoglobulina A, os peptídeos antibacterianos e o complexo proteico da junção (SUZUKI, 2020). Tratando-se de um dos componentes primordiais dessa barreira seletivamente permeável, tem-se o epitélio intestinal, que é composto por uma monocamada de células epiteliais colunares justapostas, que limitam o ambiente luminal do não luminal (MATHEUS, 2016), as ações da barreira intestinal são citadas também por atuarem por vias transcelular e paracelular (GROSCHWITZ, HOGAN, 2009).

Com relação à via paracelular, essa se encontra associada ao transporte de íons, água e outras moléculas no espaço entre as células epiteliais e é regulada por complexos intercelulares localizados na junção apical-lateral da membrana e ao longo da membrana lateral (PODOLSKY, 1999). O contato entre as células epiteliais intestinais inclui três componentes que podem ser identificados no nível ultraestrutural: desmossomos, junções aderentes (JAs) e junções apertadas/*tight junctions* (TJs) (GROSCHWITZ, HOGAN, 2009).

Sendo assim, a permeabilidade paracelular é regulada, principalmente, pelas interações entre as regiões extracelulares das proteínas transmembranares de células adjacentes (SUZUKI, 2020), constituídas em destaque pelas TJs, onde essas possuem o principal determinante da barreira física intestinal, tendo sua estrutura composta por: claudinas (FURUSE et al., 1998), ocludinas (FURUSE et al., 1993), tricelulinas (IKENOUCHI et al., 2005), moléculas de adesão juncional-A (MARTÍN-PADURA et al., 1998) e proteínas de placa intracelular, como zônulas ocludentes (ZO) e cingulinas (CITI et al., 1988).

A integridade se mantém dependente da regulação das TJs, que possuem uma estrutura dinâmica e regulável, na qual a permeabilidade se

altera por decorrência de inúmeros estímulos, como: nutrientes, sinalização humoral ou neuronal e/ou mediadores inflamatórios (GROSCHWITZ, HOGAN, 2009). Desse modo, se atribui às TJs importantes funções no epitélio do TGI, tanto em condições fisiológicas como patológicas.

No que diz respeito aos processos patológicos, o desequilíbrio da função de barreira intestinal é um dos principais mecanismos da Dispepsia Funcional (DF), que sem um fator causador definido, se trata de uma patologia de caráter multifatorial (figura 1). Tratando-se de um distúrbio da digestão, os principais sintomas da DF são referidos por acometer ao sistema gastroduodenal, que são plenitude pós-prandial, saciedade precoce, dor epigástrica e queimação (SAHAN et al., 2018; TALLEY; ALEXANDER, 2015), sendo esses baseados nos critérios de Roma IV e caracterizados por períodos de abrandamentos e exacerbações (DROSSMAN et al., 2006; DROSSMAN et al., 2016). Esses sintomas são responsáveis por classificar um indivíduo como dispéptico e estão relacionados ao TGI superior, cujo aparecimento e piora se relacionam à alimentação e/ou ao estresse (TALLEY et al., 2006).

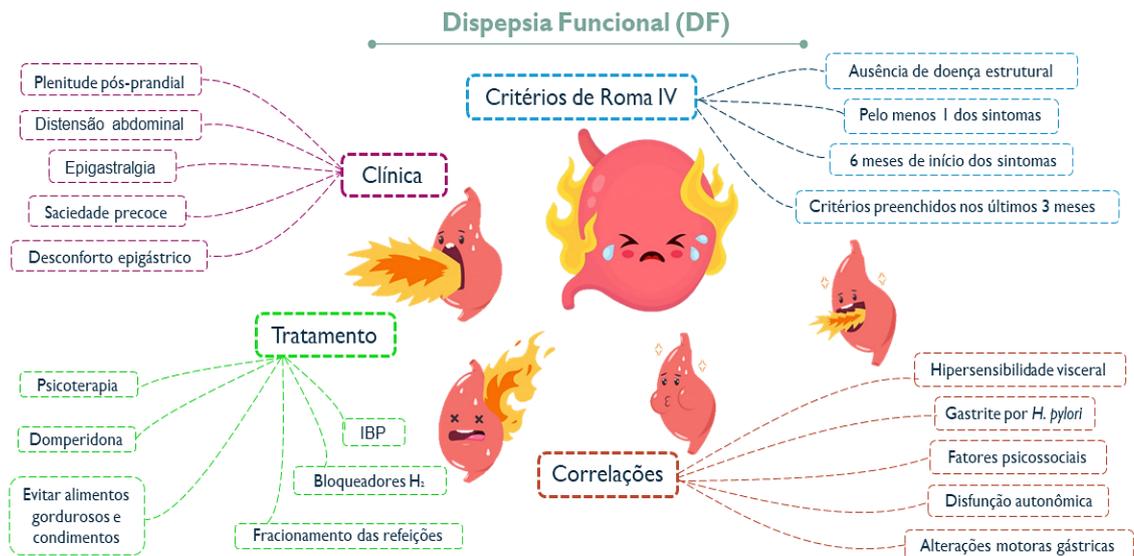
O diagnóstico da DF se dá após avaliação completa, a partir da obtenção dos dados clínicos e do teste do esvaziamento gástrico, associado a endoscopia digestiva sem demonstrar lesões no estômago ou duodeno que possam ser responsáveis pelos sintomas (MAHADEVA; GOH, 2006).

Com relação ao aparecimento dos sintomas, cerca de 80% dos indivíduos dispépticos não apresentam alteração estrutural, ou seja, nenhuma outra complicação para o surgimento dos sintomas da DF. Estudos mostram que os principais fatores de riscos envolvidos no desenvolvimento de DF são comorbidade psicológica, gastroenterite aguda, sexo feminino, tabagismo, uso de anti-inflamatórios não esteroidais e infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (FORD et al., 2020).

Com relação à epidemiologia, a DF é um dos transtornos gastroduodenais que afeta comumente a população geral, cerca de 10-30% no mundo (MAHADEVA; GOH, 2006), porém não apresenta risco de vida para os pacientes, mas causa impacto significativo na qualidade de vida (EL-SERAG, TALLEY, 2003; MONES et al., 2002). Além disso, os gastos com serviços de saúde, diagnóstico e tratamento dos sintomas da DF representam expressivos

encargos financeiros para a sociedade (MOAYYEDI; MASON, 2002; HAYCOX et al., 1999). Nesse sentido, torna-se necessário encontrar estratégias de elucidação da fisiopatologia da DF, a fim de encontrar melhores e mais eficazes estratégias de tratamento que reduzam os encargos clínicos e os custos econômicos.

Figura 1 – Principais fatores envolvidos na Dispepsia Funcional



Fonte: autor da pesquisa.

Na DF se tem como principais fatores envolvidos na indução de danos na barreira do tecido intestinal a acidez, a bile, a microbiota e os antígenos alimentares. Tais fatores são responsáveis por ocasionar o dano e, conseqüentemente, acarretar o desenvolvimento de sintomas característicos de pacientes dispépticos (GROSCHWITZ, HOGAN, 2009; MATHEUS, 2016).

Com base nisso, reduzidas são as opções de tratamento com eficácia estabelecida, devido a inúmeros desafios como falta de fisiopatologia definida e de desfechos validados. Na prática clínica, o que se é aplicado constantemente são os usos de medicamentos *off-label* (uso de um medicamento que não é indicado para aquela patologia com o intuito de reduzir a sintomatologia).

Os principais fármacos utilizados como terapia para DF são: os Inibidores de Bombas de Prótons (IBPs), responsáveis pela inibição da H⁺/K⁺ ATPase, impedindo a secreção de ácidos estomacais; o Alginato, um polissacarídeo natural, que forma uma barreira de ácido algínico no estômago fornecendo um

efeito ácido-neutralizante (ROHOF et al., 2013); e o Sucralfato, que age de forma eficaz na proteção da mucosa gastroduodenal ao formar um biofilme protetor sob o tecido gástrica, realiza adsorção de pepsina e ácidos biliares e estimula a secreção de bicarbonato e muco (SZABO, HOLLANDER, 1989). Contudo, pelo fato de não serem fármacos direcionados para a DF, se faz necessário estudos acerca de alternativas terapêuticas que possam abranger diretamente essa afecção.

Devido a isso, a busca por produtos naturais que venham a reverter danos de patologias que acometem o TGI se encontram em constante ascensão, por demonstrarem poucos efeitos adversos e resultados promissores. Dentre esses se tem a Goma do Cajueiro (GC), um polímero natural e versátil biomaterial que demonstrou resultados positivos em pesquisas. Esse heteropolissacarídeo natural é proveniente da resina do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) após sutis incisões em seu caule (KUMAR et al., 2012), na qual apresentou propriedades imunomoduladora em macrófagos; proteção em úlceras gastroduodenais induzidas por AINEs em modelo experimental; efeito protetor do tecido esofágico em modelo de doença do refluxo; êxito na cicatrização de ferimentos; perfil anti-inflamatório na doença periodontal experimental em ratos; eficácia como protetor tópico em laringes de camundongos; e efeito adesivo em superfícies inertes (LIMA et al., 2002; NICOLAU, 2018; MOREIRA et al., 2015; YAMASSAKI et al., 2015; CARVALHO et al., 2015; LEITE et al., 2017; FIGUEIREDO et al., 2017; SOUZA FILHO et al., 2018).

Outro produto natural que vem ganhando espaço no cenário científico é a Goma do Angico (GA), proveniente da árvore cientificamente conhecida como *Anadenanthera colubrina*, considerada rica em bioativos e de múltiplas aplicações e propriedades biológicas. A GA se encontra em destaque pelas suas ações bioquímicas (WIJESEKARA et al., 2011), na indústria farmacêutica como matéria prima em formulações farmacêuticas e vacinas (BONTEN et al., 2015), por possuir importância nutricional (SIMPSON, CAMPBELL, 2015), além de ações farmacológicas, inclusive no TGI (ALMEIDA et al., 1995; ILLURI et al., 2015). Outros pontos positivos da GA são seus efeitos relacionados com respostas imunomodulatórias no suporte ao tratamento antineoplásico, bem

como na atividade antioxidante in vitro e in vivo (MORETÃO et al., 2003) e seus efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos em modelo animal de inflamação aguda (SANTOS et al., 2013) e cicatrização de ferida (PESSOA et al., 2012).

Em vista disso, com base nas limitações dos tratamentos tópicos atuais e na complexidade dos aspectos fisiopatológicos acerca do conhecimento da DF relacionada ao duodeno, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da acidez, pepsina e sais biliares na integridade da mucosa duodenal de camundongos e investigar os efeitos protetores de tratamentos tópicos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos funcionais do Trato Gastrointestinal: o Duodeno

O TGI é composto, principalmente, por esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso. Passado o processo de deglutição, em órgãos precedentes, no estômago que se ocorre a digestão das proteínas do conteúdo alimentar, na qual secreções são adicionadas formando o quimo (SILVERTHORN, 2010) com o auxílio de células secretoras epiteliais e órgãos glandulares acessórios (glândulas salivares, vesícula biliar e pâncreas) (CRISTO, COOPER DOCKERY, 2016).

Durante o processo digestivo, as glândulas oxínticas (formadoras de ácido) fazem parte da mucosa gástrica e secretam ácido clorídrico (HCl), pepsinogênio, fator intrínseco e muco. As glândulas oxínticas típicas são compostas por três tipos de células: células mucosas, células pépticas e células parietais (que secretam HCl e o fator intrínseco) (GUYTON; HALL, 2017). Secretada pelas células pépticas, o pepsinogênio não tem atividade digestiva e assim que entra em contato com o HCl, é clivado para formar pepsina ativa. Além disso, o HCl quebra as moléculas proteicas e expõe as ligações químicas entre os aminoácidos, que conseqüentemente são cortadas pela pepsina (CRISTO, COOPER DOCKERY, 2016). A pepsina é uma protease ácida com atividade máxima entre os pH 1.9 e 3.6, observando-se ainda uma atividade mensurável até o pH 6 (JOHNSTON et al., 2007a) e apesar de inativa em pH acima de 6.5, a literatura demonstra que, sob 37 °C, a pepsina pode permanecer estável em pH 7 por mais de 24 horas, tendo sua atividade próxima a 80% da original, quando reacidificada. Em junção, o HCl e a pepsina são de suma importância para a digestão das proteínas no estômago (GUYTON; HALL, 2017).

De grande relevância, seguindo com o processo de digestão, posterior ao estômago, encontra-se o intestino delgado, que se subdivide nas porções duodeno (25cm), jejuno e íleo (juntos cerca de 260 cm de comprimento) no homem. Principalmente no duodeno e na porção inicial do jejuno que se é dado o prosseguimento da digestão, no qual ocorre pela ação conjunta de enzimas intestinais e componentes das secreções salivares, gástricas, pancreáticas e

biliares. O conteúdo desses órgãos adentra o duodeno sendo controlados pelo esfíncter hepato pancreático/esfíncter de Oddi e desse modo ocorre o controle para que o líquido pancreático e a bile somente entrem no intestino delgado nos períodos necessários, como durante uma refeição (SILVERTHORN, 2010).

Dessa forma, se evidência o duodeno, o ponto de entrada entre o estômago e intestino, local onde se recebe o quimo que é envolvido à bile advinda da vesícula biliar e anteriormente fígado. Após a união desses compostos, pelo fato do quimo ser proveniente do estômago, ocorre alteração do pH ao chegar no duodeno e enzimas digestivas são ativadas (MOORE, DALLEY, AGUR, 2014). O duodeno compõe a primeira porção do intestino delgado, tem seu começo no piloro do estômago e fim na junção duodeno-jejunal, com função atrelada ao transporte, digestão e absorção de nutrientes (RODRIGUES, MENIN, 2008).

Tratando-se da arquitetura duodenal, esse é possuidor de múltiplas vilosidades formadas por epitélio e um eixo de tecido conjuntivo frouxo (mucosa), revestidas por um epitélio simples cilíndrico. As principais células componentes envolvidas na formação do duodeno são: células absorptivas ou enterócitos, que são responsáveis pela absorção nutritiva; células caliciformes, secretoras de glicoproteínas que lubrificam e umidificam a superfície da mucosa; células enteroendócrinas; e células de Paneth (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013).

Fisiologicamente, a mucosa gástrica se encontra com seu sistema imunológico em homeostase, até mesmo em processo digestivo, e assim possui perfil microbiano limitado. Ao ocorrer perturbações no equilíbrio da mucosa devido à inflamação duodenal, se ativa o sistema imunológico alterando o perfil microbiano o que pode acarretar distúrbios, como a Dispepsia Funcional (DF) (WALKER, TALLEY, 2017).

Desse modo, quando alterado a mucosa intestinal sob condições patológicas, levando a um quadro de inflamação no intestino que pode provocar alterações estruturais expressivas, como infiltração de polimorfonucleares (NUSRAT et al., 1997), desequilíbrio de agentes oxidantes e antioxidantes e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (BARBOZA, 1999). E assim, essas alterações trazem dano sob o complexo proteico da junção, que

acarreta prejuízo na função de barreira, promove aumento de permeabilidade e dificulta a absorção de nutrientes, aspectos de suma importância no desenvolvimento de patologias (SEIDLER et al., 2006).

2.2 Dispepsia Funcional

A DF é uma das alterações resultantes da disfunção de barreira intestinal (MATHEUS, 2016), no que diz respeito ao seu ponto originário, os dados emergentes apontam com cada vez mais frequência que o duodeno se trata de uma região-chave subjacente à sua fisiopatologia, já que esse desempenha um papel importante no controle e coordenação da função gastroduodenal (WAUTERS et al., 2019).

Com relação aos dados epidemiológicos da DF, sua incidência é de 3 a 5% por ano e afeta cerca de 10 a 30% dos indivíduos no mundo, se fazendo presente em torno de 40% da população brasileira (MAHADEVA, GOH, 2006), que apresenta sintomas dispépticos definidos pelo critério de ROMA IV, e assim, sendo um dos distúrbios gastrointestinais mais prevalentes (KOMORI et al., 2009).

Referente à sintomatologia, a literatura descreve como principais: plenitude pós-prandial, saciedade precoce, dor epigástrica e queimação. Se subdividindo em síndromes, onde os critérios de ROMA IV as classificam em dois subgrupos, a síndrome da dor epigástrica incômoda ou queimação epigástrica (SDE) e a síndrome do desconforto pós-prandial (SDP), sendo apresentadas nos últimos 3 meses e com início 6 meses antes do diagnóstico (WALKER, TALLEY, 2017). Valendo ressaltar que para caracterizar tal patologia se necessita da apresentação de sintomas dispépticos na ausência de doença orgânica, sistêmica ou metabólica subjacente que venha a justificar tais sintomas (VANHEEL et al., 2020).

Tratando-se da origem dos mecanismos que justifiquem o surgimento dos sintomas da DF, no que diz respeito a SDP, hipóteses acreditam que os sintomas envolvidos com a síndrome se originam da disfunção motora gástrica, incluindo acomodação gástrica prejudicada, o que acarreta redistribuição distal de uma refeição e, conseqüentemente, sobrecarga antral. Essa inibição parcial da acomodação gástrica pode piorar os sintomas. Com relação ao retardo do

esvaziamento gástrico, indica-se que esse também esteja implicado na ocorrência de principalmente náuseas, vômitos e plenitude pós-prandial. Porém, a literatura evidencia que a associação entre a taxa de esvaziamento gástrico e os sintomas é inconsistente. Já a dor epigástrica, tem a sua associação à hipersensibilidade mecânica do estômago que também se relaciona às sensações não dolorosas, como plenitude pós-prandial, inchaço e eructação (FORD et al., 2020).

Ao se analisar o papel da hipersensibilidade, observou-se que tanto o aumento da sensibilidade ao ácido exógeno e endógeno no duodeno quanto a diminuição da depuração do ácido foram associados à náusea. Com ênfase no ácido exógeno no duodeno, por mais que em quantidades maiores do que as produzidas fisiologicamente, ocasiona diminuição do limiar de desconforto à distensão estomacal e inibe a acomodação gástrica em resposta a uma refeição. Além disso, tendo em vista o receptor vanilóide de potencial transitório tipo 1 (TRPV1), outra análise mostrou que esse é ativado seletivamente pela capsaicina induzindo a liberação de neuropeptídeos, como peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - 1 (CGRP-1) e substância P, e assim aumentando a sensibilidade visceral e sintomas, incluindo a dor abdominal e náusea (HAMMER; VOGELSANG, 2007).

Dessa forma, pelo fato de a DF ser uma patologia que se comporta de modo heterogêneo, essa é possuidora de padrões sintomáticos decorrentes da associação de vários distúrbios fisiopatológicos e se caracteriza pela presença de um ou mais sintomas originários da região gastroduodenal (STANGHELLINI et al., 2016).

No que diz respeito à integridade duodenal em pacientes dispépticos, a literatura já evidencia um diferencial na função da barreira intestinal prejudicada, onde essa está associada no início e na persistência da DF, induzindo inflamação de baixo grau. Indivíduos com DF apresentam também diminuição de resistência transepitelial (RETE) e aumento de permeabilidade na mucosa duodenal (BEECKMANS et al., 2020), associando-se à expressão alterada de proteínas de adesão celular (TJs, JAs e desmossomos) (VANHEEL et al., 2013).

Descobertas recentes mostraram diminuição de expressão de Ocludina e ZO-1, onde essas TJs estão implicadas na regulação da fenda de passagem na DF, sendo essa uma rota de baixa capacidade sem seletividade de carga e que permite a passagem limitada de moléculas maiores (SHEN et al., 2011). Assim, defeitos nessa via podem facilitar a passagem de antígenos dietéticos e produtos bacterianos através da barreira epitelial, por meio da qual eles podem entrar no próprio tecido e possivelmente induzir alterações inflamatórias (VANHEEL et al., 2013).

2.3 Agentes envolvidos na dispepsia funcional

Com relação à integridade da mucosa duodenal em pacientes dispépticos, são incluídos como principais fatores indutores de defeitos na barreira intestinal: acidez, bile, microbiota e antígenos alimentares (WAUTERS et al., 2019).

2.3.1 Acidez no epitélio duodenal

Fisiologicamente, as secreções do intestino delgado têm seu pH variável entre 7.5 a 8. Com relação ao mecanismo de secreção ácida, esse ocorre por meio das células parietais nas glândulas gástricas, que secretam o HCl no lúmen do estômago. Com uma secreção média de até 3 litros por dia, o pH luminal gástrico é tão baixo que pode chegar a 1, porém o pH citoplasmático das células parietais se encontra em torno de 7.4, pelo fato de as células bombearem H^+ (hidrogênio) contra o gradiente de concentração tornando-o 1,5 milhão de vezes mais concentrado no lúmen. Quando presente no lúmen estomacal, o HCl causa a liberação e a ativação da pepsina; desencadeia a liberação de somatostatina pelas células D; desnatura proteínas por quebrar as ligações dissulfeto e de hidrogênio, que mantêm a estrutura terciária da proteína; podem deixar as ligações peptídicas entre os aminoácidos das cadeias proteicas desnoveladas mais acessíveis à digestão pela pepsina; ajuda a destruir bactérias e microrganismos ingeridos; e inativa a amilase salivar, cessando a digestão de carboidratos (SILVERTHORN, 2010).

Quando o HCl passa a ser secretado no lúmen, o dióxido de carbono (CO_2) e hidroxila (OH) da água é absorvido para o sangue formando o

bicarbonato (HCO_3^-). A ação tamponante do bicarbonato torna o sangue menos ácido ao deixar o estômago, criando uma maré alcalina de pH próximo a 7, mesmo quando o pH luminal é bastante ácido (aproximadamente 2). O fígado, pâncreas e intestino produzem cerca de 3 litros de secreções diariamente, necessárias para digerir componentes nutricionais, dentre essas secreções se tem o HCO_3^- , que vai para dentro do intestino delgado e neutraliza o quimo. Grande parte desse HCO_3^- é advindo do pâncreas, com uma pequena porção secretada por células duodenais, e se libera em resposta a estímulos neurais e à secretina. Quando secretado para o duodeno o HCO_3^- neutraliza o ácido proveniente do estômago, no qual para sua produção se requer altos níveis da enzima anidrase carbônica (SILVERTHORN, 2010).

Casos de hiperacidez podem ocorrer por falha na barreira muco-bicarbonato ou por secreções excessivas de gastrina (Síndrome de Zollinger-Ellison). Por conta da hiperacidez estomacal, a acidez no estômago tem os mecanismos protetores superados e assim se ocorre úlcera péptica. Nessa problemática, o HCl e a pepsina destroem a mucosa, estendendo os danos para a região interna da submucosa e muscular do estômago e duodeno (SILVERTHORN, 2010).

Embora nenhuma associação causal da dispepsia com os sintomas tenha sido demonstrada de forma convincente, teorias envolvendo os danos do epitélio com a acidez são cada vez mais frequentes (VANHEEL et al., 2020). De tal modo, a integridade da mucosa duodenal prejudicada, uma hiperpermeabilidade, e a inflamação duodenal de baixo grau se associam com sinalização neuronal alterada e à ativação imune sistêmica. Desse modo, essas alterações podem, em última instância, levar a sintomas dispépticos (VANHEEL et al., 2013).

Tendo em vista a acidez como fator causador da diminuição da integridade da mucosa, a literatura já retifica tal acometimento em órgãos adjacentes, como no esôfago e laringe, que foram analisados por meio pesquisas em modelo animal (FARRÉ et al., 2008; GHATAK et al., 2016; PARDON et al., 2016; BORSARO, 2017). No que se refere à RETE laríngea, analisou-se uma queda dependente de pH fracamente ácido (pH 5) e que persistiu ao se associar com pepsina e sal biliar (BORSARO, 2017), valendo

ressaltar que a ocorrência de tal acometimento se mostrou independente da presença de pepsina; sendo a permeabilidade também vista como outro fator de análise de integridade, essa se apresentou aumentada quando o tecido foi exposto ao pH 5 em junção ao ácido biliar (BORSARO, 2017). Tratando-se do esôfago, inúmeros são os estudos que abordam alterações na barreira do epitélio em decorrência de componentes presentes no refluxato (conteúdo estomacal ácido que retorna para o esôfago), que assim ocasionam alteração na RETE, permeabilidade e indução de alargamento do espaço intercelular (FARRÉ et al., 2008). Por tais achados se confirmou, por meio de mimetizações de episódios de refluxo gastroesofágico, que o principal fator causador do aumento dessa permeabilidade paracelular é a alteração na conformidade das TJs, podendo esses estarem associados à exposição de soluções ácidas e aos sais biliares (FARRÉ, et al. 2008; GHATAK et al., 2016; PARDON et al., 2016; BORSARO,2017).

2.3.2 Sais biliares

Os sais biliares são os principais componentes orgânicos encontrados na bile, sintetizados nos hepatócitos (células do fígado) e armazenados na vesícula biliar. São responsáveis por permitir a excreção do colesterol e de compostos tóxicos, como a bilirrubina e os metabólitos vindos de medicamentos. O duodeno, a primeira porção do intestino delgado, é o local onde os sais biliares são secretados e em seguida são reabsorvidos pelo fígado, onde são reutilizados (MCDONALD et al., 2010).

Em humanos, os ácidos primários são o ácido cólico (CA) e o ácido quenodesoxicólico (CDCA), que se conjugam preferencialmente com glicina e taurina após a síntese para se tornarem sais biliares. A taurina é um aminoácido sulfurado produzido a partir da cisteína, que, dessa forma, é provedor da metionina. Pela sua estrutura, a taurina não pode ser incorporada a peptídeos ou proteínas, permanecendo livre até que seja ligada aos ácidos biliares (HAYES, 1982). Quando conjugados com taurina e com glicina, originam-se os ácidos biliares conjugados taurocólico/glicocólico e tauroquenocólico/glicoquenocólico, em decorrência da conjugação ocorre a redução do pKa (constante de dissociação ácida), para aproximadamente 4, o

que os mantêm nas suas formas ionizadas em pH intestinal (LIEBERMAN, MARKS, 2013). Dessa forma, os sais aumentam sua solubilidade aquosa e podem atingir altas concentrações luminiais, facilitando a digestão e absorção dos lipídios da dieta (LIEBERMAN, MARKS, 2013).

Quando conjugados, os sais biliares são secretados na bile e permanecem armazenados na vesícula biliar, até a liberação na primeira porção do intestino delgado (NELSON, COUTO, 2006). Essa liberação, no lúmen intestinal, se dá por meio do estímulo do hormônio colecistoquinina (GUYTON; HALL, 2017). A liberação da bile ocorre de maneira necessária após a alimentação e durante os períodos de jejum, o ducto biliar comum permanece fechado por meio de um esfíncter de musculatura lisa, que é responsável pelo controle do ducto (SAMUELSON, 2007).

Uma vez no lúmen, a microbiota intestinal metaboliza os ácidos biliares primários em ácidos biliares secundários por meio de desidroxilação e desconjugação dos ácidos biliares. A metabolização ocorre por meio das hidrolases de sais biliares expressas pela microbiota, que apresentam alta afinidade pelos ácidos biliares conjugados com glicina. Já os ácidos biliares não conjugados e não carregados, passam para o jejuno para serem reabsorvidos passivamente pelo epitélio, enquanto os ácidos biliares conjugados são reabsorvidos ativamente no íleo através do transportador apical de ácido biliar dependente de sódio (ASBT) e quaisquer ácidos biliares restantes são metabolizados pela microbiota colônica e reabsorvidos. No demais, grande parte dos ácidos biliares que entram no intestino são reabsorvidos e cerca de 5% são excretados pelas fezes (NELSON, COUTO, 2006).

Grande parte dos ácidos biliares são conjugados (cerca de 98%) com glicina ou taurina, já em sua forma livre, correspondem a menos de 2% e estão presentes no lúmen intestinal (McQUAID et al., 2011). Com base nisso, de acordo com a literatura, sabe-se que os efeitos citotóxicos dos ácidos biliares se relacionam a sua hidrofobicidade (BEECKMANS et al., 2020) e pacientes que utilizam de fármacos interferentes no pH estomacal, como IBPs, tendem a alterar e apresentar pH gástrico fracamente ácido, favorecendo assim a

desconjugação dos ácidos e, por consequência, aumento de sua presença em forma livre (THEISEN et al., 2000).

2.4 Tratamentos para a Dispepsia Funcional

No que diz respeito à terapêutica, com relação às mudanças no estilo de vida, por mais que alguns alimentos estejam implicados no desenvolver dos sintomas de DF, poucas evidências existem para sugerir que mudanças em prol de melhores hábitos ou exercícios levem à melhora dos sintomas, sendo escassos os ensaios existentes relacionando a DF com sua melhoria por meio de manipulação dietética. Dessa forma, a terapia medicamentosa é a base do tratamento, embora a maioria das intervenções têm eficácia modesta e nenhuma comprovadamente altera o curso da DF a longo prazo (FORD et al., 2020).

Reduzidas são as opções de tratamento com eficácia estabelecida, devido a inúmeros desafios como não ter uma fisiopatologia definida e falta de desfechos validados. Na prática clínica, o que se é aplicado constantemente são os usos de medicamentos *off-label* (uso de um medicamento que não é indicado para aquela patologia com o intuito de reduzir a sintomatologia). Porém os IBPs são considerados a terapia inicial mais eficaz, especialmente para SDE. Já em SDP, com o intuito de acelerar o esvaziamento gástrico, recomenda-se a utilização de procinéticos (VANDENBERGHE, 2020). Com base na literatura, atualmente no tratamento da dispepsia se atribui eficácia significativa ao uso de IBPs e outros compostos envolvidos na terapia supressora de ácido/antiácidos (VANDENBERGHE, 2020).

2.4.1 Alginato

Tratando-se de supressores de ácidos, tem-se o alginato, um polissacarídeo natural que possui em sua composição bicarbonato de sódio que reage com o ácido gástrico e forma uma barreira de ácido algínico no estômago, com o potencial de agir sob os sintomas pós-prandiais, devido à sua ação no estômago proximal, fornece um efeito ácido-neutralizante (ROHOF et al., 2013).

Quando ingerido, o alginato tem ação rápida formando um precipitado viscoso no conteúdo estomacal, semelhante a um gel de baixa densidade que flutua no topo do estômago, neutralizando o conteúdo de ácido e proporcionando uma barreira física ao refluxo que é retida durante o esvaziamento gástrico (KWIATEK et al., 2011).

Esse fármaco tem como vantagens atrativas segurança, abundância, custo relativamente baixo e biodegradabilidade (SANCHEZ-BALLESTER, 2021). Os alginatos são polissacarídeos hidrofílicos compostos por copolímeros lineares, contendo em sua composição ácido β -D-manurônico e α -L glurônico ligados (LEE, MOONEY, 2012). Esses polímeros aniônicos são extraídos principalmente de algas marrons, como *Ascophyllum*, *Durvillaea*, *Ecklonia*, *Laminaria*, *Lessonia*, *Macrocystis* e *Saccharina* (ANDRIAMANANTOANINA, RINAUDO, 2010A, 2010B; VAUCHEL et al., 2009; GOMEZ, PEREZ, LOZANO, RINAUDO, VILLAR, 2009; PETEIRO, 2017); e também podem ser extraídos de fontes bacterianas (por exemplo, *Azotobacter vinelandii*).

2.4.2 Sucralfato

Um tratamento frequentemente utilizado na DF é o Sucralfato, dado como um dos primeiros compostos clinicamente útil e de caráter citoprotetor. Tratando-se de um agente não sistêmico e eficaz na proteção da mucosa gastroduodenal contra lesões, seus mecanismos envolvidos no êxito das ações protetoras e terapêuticas são: adsorção de pepsina e ácidos biliares; estimulação da secreção de HCO_3^- e muco; e estimulação da síntese endógena de prostaglandinas. O Sucralfato compete com as pepsinas pelos seus substratos, tem capacidade moderada de adsorver ácidos biliares e foi pensado para formar uma barreira física e prevenir fatores agressivos de produzir mais danos às áreas ulceradas no estômago e duodeno (SZABO, HOLLANDER, 1989). Em estudos clínicos e experimentais, esse composto estimulou a síntese endógena e a liberação de prostaglandina e inibiu a liberação de tromboxano. No que diz respeito à integridade da mucosa, o sucralfato tem caráter protetor na integridade vascular e na zona proliferativa. Não estando estruturalmente relacionado com prostaglandinas ou antiácidos e também não estando claramente relacionado com os antagonistas do receptor

Hz, o sucralfato é relativamente insolúvel em soluções aquosas, liga-se facilmente a áreas mucosas normais e anormais no estômago e duodeno e é promotor de potente atividade citoprotetora. Sendo, com base nisso, o fármaco aplicada à teoria popularmente como “*BandAid*” (Hollander e Tarnawski, 1990).

2.5 Biopolímeros e a proteção epitelial

O uso de produtos naturais nas pesquisas se mostram cada vez mais frequentes, tendo esses sido fonte para buscas de novas abordagens terapêuticas em patologias que acometem TGI e também nas procuras por drogas que venham a proteger contra danos na integridade tecidual do sistema gastrointestinal (SALEHI et al., 2016). Dessa forma, as pesquisas por novos compostos que causam proteção da queda de integridade tecidual em laringe e esôfagos de camundongos se encontra em constante ascendência (SALES, 2018; NICOLAU, 2018; CARMO NETO, 2020; BINGANA, 2020), podendo assim tais estudos serem também contribuintes para a busca de alvos terapêuticos para afecções duodenais.

Com base nisso, nosso grupo de pesquisa tem estudado a ação de bioprotetores tópicos (figura 2), dessa forma ao se analisar o efeito de proteção do polissacarídeo sulfatado da alga *Gracilaria caudata*, em esôfago humano de pacientes com Doença do Refluxo Gastresofágico (DRGE), a aplicação tópica de tal composto preveniu alterações na mucosa de biópsias de pacientes sem erosão (SALES 2018).

Tratando-se de outra substância, a Goma do Cajueiro (GC), um polissacarídeo derivado da árvore *Anacardium occidentale L.*, quando avaliado seu efeito sob aplicação tópica a 5% em biópsias de esôfago humano (desafiadas com solução ácida, em associação com pepsina e ácido biliar), percebeu-se a ocorrência de efeito protetor contra queda de RETE (DE LIMA et al., 2016); em laringes de camundongos, tal composto se mostrou também preventivo da queda de RETE e aumento de permeabilidade após submetidas à soluções fracamente ácidas associadas a ácidos biliares presentes (BORSARO, 2017); já em outro estudo, tanto experimental como também pré-clínico, testando GC (5% e 10%) em esôfago, foi-se demonstrado o potencial efeito protetor contra exposição a componentes de refluxato (NICOLAU, 2018).

Outra Goma também utilizada, obtida da casca da *Anadenanthera colubrina*, um biopolímero da Goma do Angico (GA) evidenciou de mesmo modo seu potencial protetor na mucosa laríngea e esofágica de camundongos, onde no presente delineamento se avaliou GA (10%) demonstrando, com base nos parâmetros funcionais, efeito protetor (CARMO NETO, 2020); em uma exploração posterior, de caráter pré-clínico, evidenciou que a GA (10%), quando aplicada em biópsias de pacientes possuidores de DRGE de caráter erosivo e não erosivo, possuiu efeito tópico in vitro quando submetidas à conteúdo ácido em junção com solução de pH 2,0 contendo pepsina e ácido taurodeoxicólico – TDCA (BINGANA, 2020).

Figura 2 - Linha cronológica do uso de produtos naturais em patologias que acometem o Trato Gastrointestinal.



Fonte: autor da pesquisa.

Dessa forma, com base na literatura, a DF não apresenta riscos para a vida dos pacientes, entretanto seu impacto na qualidade de vida dos indivíduos acometidos se mostra bastante significativo. Valendo ressaltar os custos no percorrer do processo de diagnóstico e tratamento das sintomáticas da DF, sendo esses representantes de expressivos encargos financeiros para a sociedade (EL-SERAG; TALLEY, 2002; MONES et al., 2002). Apesar dos grandes avanços na pesquisa acerca da DF, a complexidade de seus aspectos fisiopatológicos ainda não é totalmente compreendida. Dessa forma, o conhecimento da fisiopatologia e prováveis fatores que venham a estar estreitamente envolvidos é de fundamental importância, pois podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Nesse sentido, a literatura existente não demonstra o causador específico da DF e de tal modo, o presente estudo se faz de suma importância para melhor elucidação dos

mecanismos envolvidos e descoberta de novos alvos terapêuticos, analisando o papel do tratamento in vitro.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da acidez, pepsina e sais biliares na integridade da mucosa duodenal de camundongos, assim como investigar possível efeito protetor de tratamentos tópicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Comparar a RETE basal do epitélio duodenal com a do mesmo sendo exposto a soluções com diferentes níveis de pH.
- Avaliar a persistência do dano causado pela acidez, após retirado do estímulo em um período mais prolongado (1 hora).
- Analisar o efeito de solução ácida em associação com pepsina e TDCA, na barreira epitelial duodenal, através da medida de RETE.
- Avaliar o efeito do GUDCA em solução ácida e neutra na RETE duodenal.
- Verificar a ação de agentes com efeitos tópicos (Alginato, Goma do Angico, Goma do Cajueiro e Sucralfato) na integridade duodenal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Drogas, reagentes e outros materiais

- Ácido Glicoursodeoxicólico (GUDCA) (Sigma®, São Paulo, Brasil).
- Ácido Taurodeoxicólico (Sigma®, São Paulo, Brasil)
- Alginato (Lufta Gastro Pro)
- Câmara de Üssing (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany)
- Fluorímetro Fluostar Optima (BMG labtech. Ontemberg, Germany)
- Lupa (Leica LED2500, Leica Microsystems)
- Goma do Angico (GA).
- Goma do Cajueiro (GC).
- Pepsina da mucosa gástrica porcina 250 unidades/mg de sólido (Sigma Aldrich).
- Quetamina (Vetnil – Vet Smart, Brasil)
- Soluções de Krebs acidificadas (pH 1; pH 1.25; pH 1.5; pH 1.75; pH 2)
- Sucralfato / Sucrafilm ® (EMS Sigma Pharma Ltda)
- Xilazina (Konig®, Mairinque, Brasil)

4.2 Animais

Foram utilizados 96 camundongos Swiss machos (20 a 30g e com o N significativo de 6 ou mais animais por grupo), provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas, em um ambiente com temperatura e luminosidade controladas, em um ciclo de 12h luz/12h escuro, com acesso a comida e água *ad libitum*.

4.3 Aspectos éticos

Todos os tratamentos e procedimentos experimentais foram realizados

de acordo com o guia de cuidado em uso de animais de laboratório do National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA) e esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará – UFC, sob protocolo n° 144405040421.

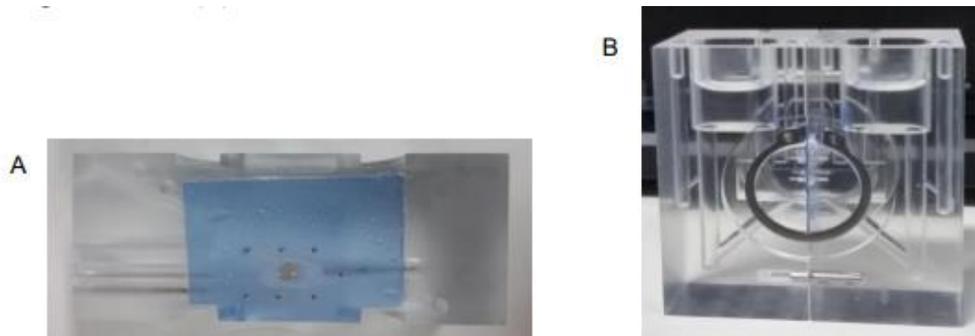
4.4 Dissecção duodenal

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de uma solução com Quetamina (100mg/Kg) + Xilazina (10mg/Kg) e eutanasiados por exsanguinação através de secção da aorta abdominal. Em seguida, realizou-se a identificação do duodeno, dissecção e remoção do mesmo que foi colocado numa placa de Petri com solução de Krebs fria (NaCl 116,25mM + MgCl₂ 6H₂O 1,2mM + NaHCO₃ 25 mM + CaCl₂ 2H₂O 1,25 mM + KH₂PO₄• 2H₂O 2 mM + Glicose 11 mM). A porção serosa rente à camada muscular foi removida e assim, utilizando uma Lupa (Leica LED2500, Leica Microsystems) para a identificação porções, se procedeu com a realização de cortes adequados para análises de resistência na Câmara de Ussing.

4.5 Resistência transepitelial (RETE)

Após dissecada, a porção duodenal foi imediatamente montada numa Câmara de Ussing (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany) adaptada, com a região da comissura anterior exatamente no orifício de 0.017cm² do adaptador (figura 3). Todas as câmaras de Ussing com os tecidos foram preenchidas com 3.5ml de solução de Krebs (NaCl 116,25mM + MgCl₂ 6H₂O 1,2mM + NaHCO₃ 25 mM + CaCl₂ 2H₂O 1,25 mM + KH₂PO₄• 2H₂O 2 mM + Glicose 11 mM) com pH 7.4 para registrar a RETE basal, calculada de acordo com a lei de Ohm através das alterações de voltagem induzidas por pulsos de corrente bipolares de 50 µA, duração de 200 ms a cada 6 s, aplicada através de fios de platina. Todos os experimentos foram realizados em circuitos abertos.

Figura 3 - Adaptador da câmara de Ussing com o tecido posicionado exatamente no orifício de 0.017 cm² (A) e câmara fechada com o tecido posicionado (B).



Fonte: BORSARO, 2017.

Após um período para equilíbrio (cerca de 30 minutos) e registro da RETE basal, a solução do lado luminal da câmara foi substituída por uma das soluções desafio. A RETE foi então continuamente gravada por 30 minutos de exposição e expressa em Ωcm^2 . O efeito das diferentes soluções teste se expressou como alteração percentual na RETE em 1, 10, 20 e 30 minutos de exposição em relação à RETE imediatamente após a colocação da solução desafio (T0).

4.6 Soluções desafio

Na primeira etapa dos experimentos, a mucosa duodenal passou pelo processo de estabilização a 30 minutos e em seguida foi exposta por mais 30 minutos às seguintes soluções desafio para análise dos parâmetros de dano epitelial, para alteração por meio da ação de pHs:

- Solução de Krebs pH 7.4 (controle)
- Solução de Krebs pH 2
- Solução de Krebs pH 1.75
- Solução de Krebs pH 1.5
- Solução de Krebs pH 1.25
- Solução de Krebs pH 1

Após analisados, escolheu-se o pH de 1.5, que reproduziu melhor

queda de RETE (queda de aproximadamente 30% a 40%), para as análises subsequentes. A fim de avaliar a persistência do dano causado pela solução de Krebs ácida em um período mais prolongado se iniciou uma nova análise, onde após o tempo de RETE basal / estabilização (30 minutos) e o de submissão à solução desafio de pH de 1.5 (30 minutos), se teve a exposição novamente do tecido duodenal à sua solução controle em pH 7.4 pelo período de 1 hora, a fim de analisar se o dano seria permanente ou não.

Em prosseguimento de fase de análise, a mucosa duodenal após a estabilização (30 minutos) foi exposta ao pH de 1.5 com acréscimo de pepsina e sais biliares por 30 minutos para análises de efeitos complementares.

- Krebs com pH 1,5 + pepsina (1 mg/ml)
- Krebs com pH 1,5 + TDCA (5 mM)
- Krebs com pH 1,5 + pepsina (1mg/ml) + TDCA (5 mM)
- Krebs com pH 7,4 + GUDCA (5 mM)
- Krebs com pH 1,5 + GUDCA (5 mM)

Posteriormente, escolheu-se o grupo que apresentou melhor estímulo na mucosa duodenal, sendo a solução de Krebs com pH 1.5, para realizar os tratamentos. Após o período de estabilização (30 min), a Câmara de Ussing foi aberta e se administrou os tratamentos tópicos no tecido duodenal (100 µl), retirou-se o excesso com solução Krebs 7.4, a câmara foi montada novamente e exposta ao melhor estímulo para analisar a prevenção do dano.

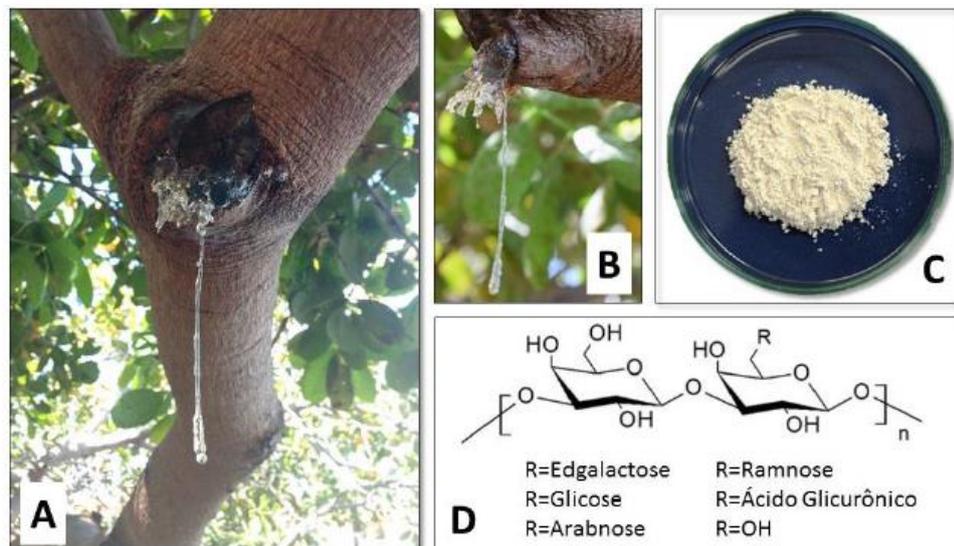
- Melhor estímulo + Krebs
- Melhor estímulo + Alginato
- Melhor estímulo + Goma do Ângico (concentração de 10%)
- Melhor estímulo + Goma do Cajueiro (concentração de 10%)
- Melhor estímulo + Sucralfato

4.7 Extração e Purificação da Goma do Cajueiro

A Goma do Cajueiro (GC) apresenta em sua composição após ser

purificada galactose (59.4%), glicose (6.4%), arabinose (5.3%), ramnose (2.4%), manose (1%), e ácido glicurônico (13.5%) que são obtidos a partir do exsudato, a GC bruta (PAULA, RODRIGUES, 1995). As amostras brutas de GC foram coletadas pelo Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC), em Parnaíba-PI (Brasil), derivadas do tronco de árvores de caju nativas (*Anacardium occidentale L.*), no município de Ilha Grande de Santa Isabel- PI (Brasil) (Latitude, graus decimais S -2,8242; Longitude, graus decimais W-41,7331). A árvore foi identificada e o espécime recebeu o comprovante de número 52, depositado no herbário HDELTA (Universidade Federal do Piauí, Parnaíba-PI, Brasil). Foram selecionados e dissolvidos os nódulos do caule em água destilada à temperatura ambiente para dar origem a uma solução de 5% (peso/volume). O pH da solução foi ajustado para aproximadamente 7.0 por adição de NaOH. A solução límpida foi sucessivamente filtrada e o polissacarídeo então precipitado com etanol (SILVA et al., 2009). A goma foi purificada como um sal de sódio utilizando o método previamente descrito (DE PAULA; SANTANA; RODRIGUES, et al., 2001).

Figura 4 - Resina extraída do troco do cajueiro (A e B), Goma do Cajueiro após purificação (C) e representação da estrutura química (D).



Fonte: NICOLAU, 2018.

4.8 Extração e Purificação da Goma do Angico (GA) (*Anadenanthera sp.*)

A Goma do Angico (GA) apresenta em sua composição um polissacarídeo composto de 67,8% de arabinose, 24,1% de galactose, 2,0% de

ramnose, 5,9% de ácido glucurônico e 5,8 % de proteína (SILVA; RODRIGUES; PAULA, 1998). O exsudado foi obtido no Município de Simplício Mendes-PI. Utilizou-se para o isolamento 12g do exsudado bruto diluído em 100 ml de água Mili-Q durante 24 horas para solubilização. Após a solubilização, 2g de NaCl foi adicionado à solução em agitação. O pH foi ajustado para 7 se utilizando NaOH. Para a precipitação da goma o conteúdo foi adicionado em um béquer contendo 30 ml de etanol, durante o período de 24h na geladeira. O precipitado formado no fundo foi separado do líquido e lavado 2 vezes com etanol para a remoção de água. O produto foi macerado e lavado novamente com etanol e logo após com acetona para a eliminação de impurezas e água. O precipitado lavado foi seco e macerado em fluxo de ar quente frequente até a obtenção da goma com coloração bege claro. O rendimento foi pesado e a goma reservada (SILVA; RODRIGUES; PAULA, 1998).

Figura 5 - Angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul).



Fonte: arvores.brasil.nom.br/new/angicobranco/index.htm/naturezabela.com.br/2011/09/angico-anadenanthera.html

4.9 Análise estatística

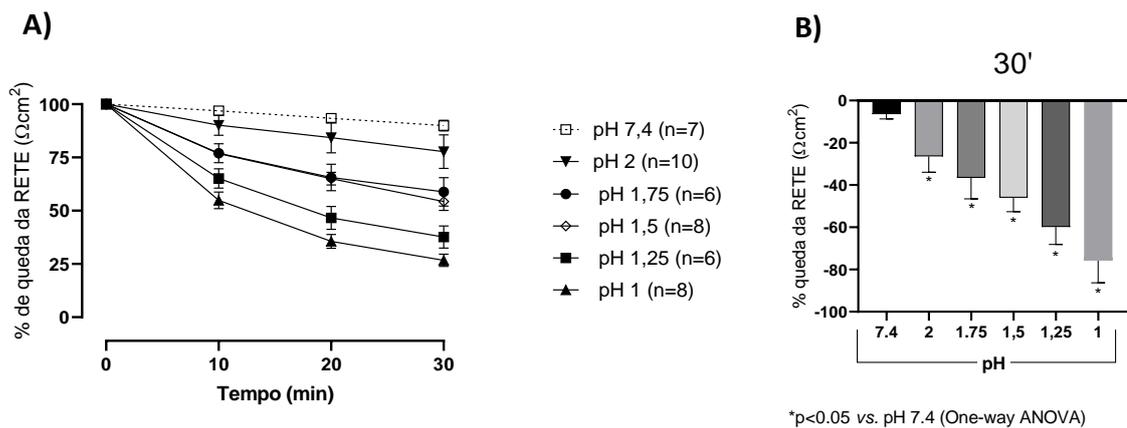
Para análise dos dados e confecção dos gráficos, se utilizou o software Graphpad Prism 8. Inicialmente, se testando a normalidade dos dados (Shapiro Wilk) para a escolha do teste a ser utilizado. Conforme a normalidade, se utilizou o teste T ou Mann Whitney e ANOVA ou Kruskal Wallis. Nos experimentos de resistência, One-way ANOVA e teste Tukey de múltiplas comparações se utilizaram quando ao comparar todos os grupos. Na análise temporal de resistência, foram utilizados two-way ANOVA e teste Bonferroni. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M), sendo considerado significativo valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito de diferentes soluções ácidas sobre a queda da RETE no epitélio duodenal

Na figura 6, nota-se uma redução temporal da RETE duodenal de camundongos quando submetidos à diferentes soluções ácidas no lado luminal em comparação ao tecido exposto ao pH 7,4 (figura 6a). Essas análises evidenciaram que a RETE da primeira porção duodenal quando exposta ao pH 2 ($67,64 \pm 7,61$), pH 1.75 ($60,96 \pm 6,37$), pH 1.5 ($59,28 \pm 3,19$), pH 1.25 ($37,65 \pm 5,22$) e pH 1 ($26,73 \pm 2,91$) no tempo de 30 minutos (figura 6b) foi significativamente ($p < 0,05$) menor quando comparados ao pH 7.4 ($90,80 \pm 1,70$).

Figura 6 - Análise de variação de resistência elétrica transepitelial do duodeno após desafio com soluções ácidas.



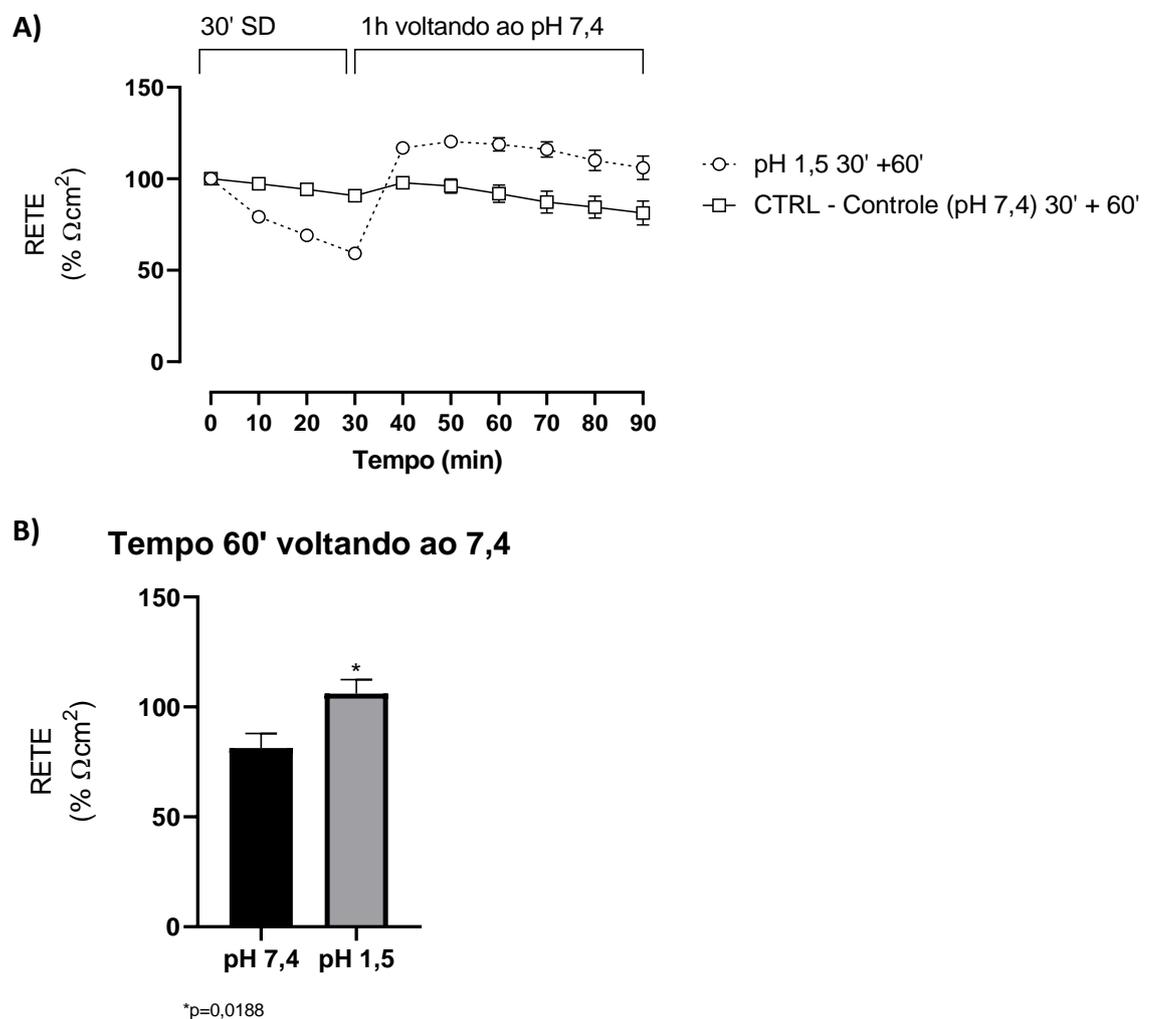
Fonte: autor da pesquisa

Ação de pHs sobre a RETE duodenal nos tempos de 10, 20 e 30 minutos. Os valores de RETE são expressos como média \pm erro padrão da média. $n = >6$. * $p < 0.05$

5.2 Avaliação de reestabelecimento da RETE do duodeno por 1h em pH 7.4 posterior aos 30 min de exposição a solução desafio

A RETE em duodeno de camundongos apresentou queda significativa de 30 a 40% quando exposta ao pH 1.5 durante o período de 30 minutos, como visto anteriormente. De forma surpreendente, observou-se que após a substituição da solução de Krebs em pH 1.5 por pH 7.4 durante 1 hora houve aumento no percentual de RETE (figura 7a), como visto após 90 minutos de exposição (pH 7.4: $81,35 \pm 6,54$ vs pH 1.5: $106,07 \pm 6,36$; $p < 0,05$) (figura 7b).

Figura 7 - Análise de dano à resistência elétrica transepitelial posterior aos 30 minutos.



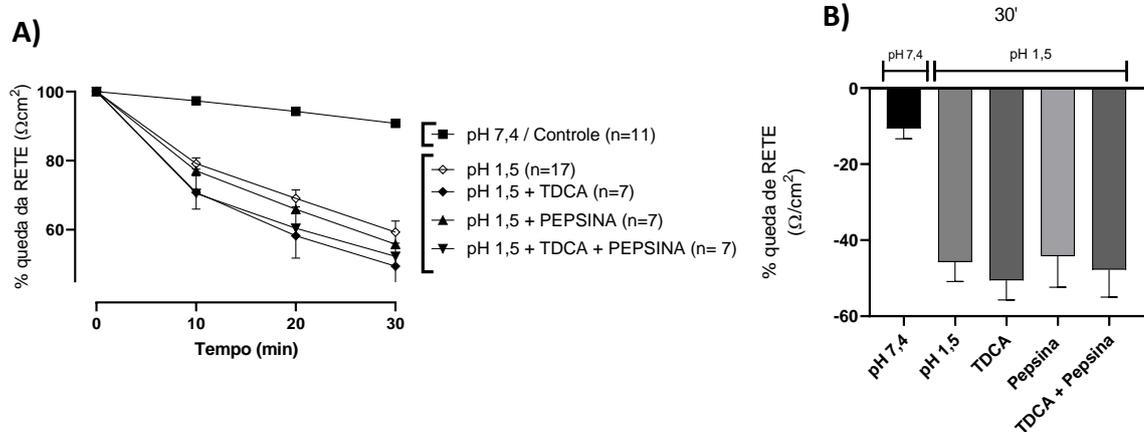
Fonte: autor da pesquisa

Análise do tecido duodenal após ter passado pela exposição de 30 minutos à solução desafio em pH 1.5, deixando-o em solução controle de pH 7.4 pelo período de uma hora. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. $n \Rightarrow 6$.

5.3 Efeitos da pepsina e TDCA em associação à solução ácida

Como observado anteriormente, houve uma queda na RETE duodenal na presença da solução em pH 1.5 ao comparar com pH de 7.4 e se manteve inalterado quando se adicionou TDCA ($49,40 \pm 5,10$), pepsina ($55,76 \pm 8,12$) e TDCA adjunto a pepsina ($52,23 \pm 7,20$) quando comparada com a queda em solução de pH 1.5 (figura 8a) após 30 minutos de exposição à solução ácida (figura 8b).

Figura 8 - Efeito da pepsina e TDCA na resistência elétrica transepitelial duodenal em solução de pH 1,5.



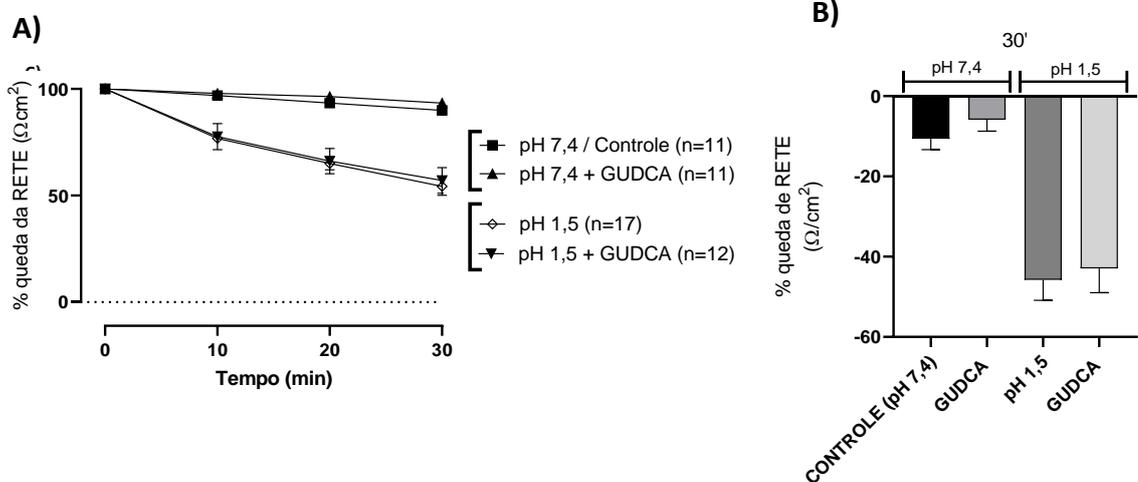
Fonte: autor da pesquisa.

Percentual da RETE inicial em resposta a exposição duodenal à soluções contendo pepsina (pep) 1mg/mL, TDCA (5mM) ou pepsina + TDCA em pH 1.5. * $p < 0.05$ vs. controle (pH1.5) (One-way ANOVA e teste Tukey). Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. $n = > 6$.

5.4 Efeito do GUDCA na RETE duodenal e em junção à solução ácida

Conforme observado na figura 9a, a adição de GUDCA não alterou a queda de RETE duodenal quando exposta à solução de pH 1.5 ($57,06 \pm 6,04$) quando comparado à solução de pH 7.4 ($93,36 \pm 2,70$). Além disso, em presença de GUDCA em solução de pH 7.4 a RETE não difere da solução onde o sal biliar está ausente (pH 7.4 vs pH 7.4 com GUDCA) (figura 9b).

Figura 9 – Efeito do GUDCA na resistência elétrica transepitelial duodenal em solução de pH 7.4 e 1.5.



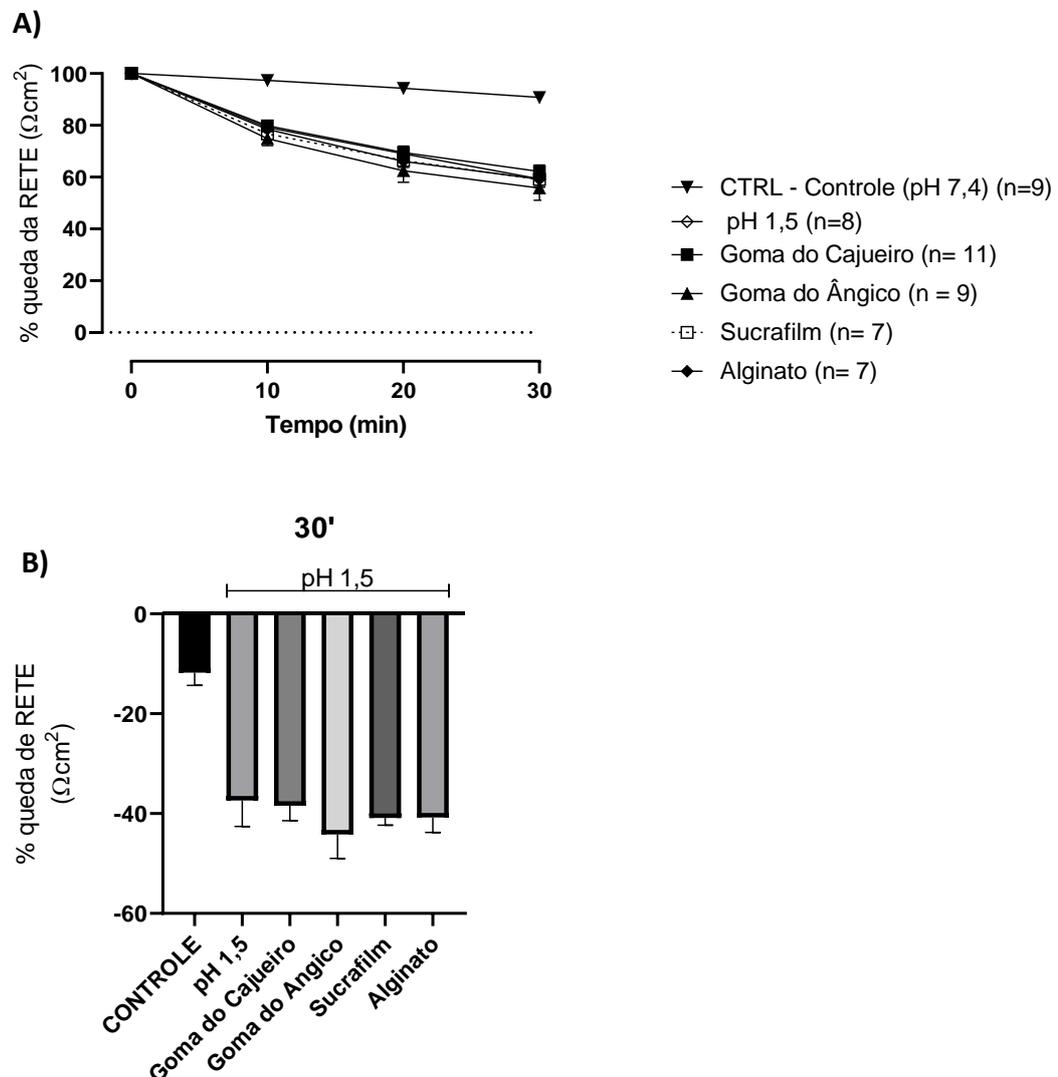
Fonte: autor da pesquisa.

Percentual da RETE inicial em resposta a exposição duodenal à soluções contendo GUDCA (5mM) em pH 1.5 e GUDCA (5mM) em pH 7.4. * $p < 0.05$ vs. controle (pH1,5) (One-way ANOVA e teste Tukey). Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. $n = > 6$.

5.5 Efeitos dos compostos tópicos na diminuição da RETE duodenal exposta à solução de pH 1.5

O tratamento tópico com as gomas GC ($62,16 \pm 2,47$), GA ($55,80 \pm 4,76$) e os fármacos alginato ($59,23 \pm 3,02$) e sucralfato ($59,14 \pm 1,48$) não reverteram a queda causada pela exposição à solução ácida com pH 1.5 ao longo do tempo (figura 10a), como se pode observar após 30 minutos (figura 10b).

Figura 10 - Efeito da Goma do Cajueiro, Goma do Angico e fármacos na resistência elétrica transepitelial do duodeno exposto à solução de pH 1.5 por 30 minutos.



Fonte: autor da pesquisa

Ação na goma do cajueiro (10%), goma do angico (10%), sucralfato e alginato na prevenção da queda de RETE da mucosa duodenal exposta à solução de ácida (pH1.5). Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. $n = > 6$. * $p < 0.05$

6. DISCUSSÃO

A DF por mais que associada a múltiplos fatores, sua etiologia não se encontra bem esclarecida e, conseqüentemente, seus tratamentos são limitados. No presente estudo, demonstrou-se por meio da exposição *in vitro* do duodeno de camundongos, que o epitélio duodenal apresenta um dano crescente à medida que se aumenta a acidez das soluções em contato com o tecido e que esse agente provocador de diminuição de RETE não ocasiona um dano permanente, já que quando retirada a solução ácida e ao expor o tecido a uma solução de pH fisiológico (7.4), a RETE consegue se restaurar. Viu-se também que, tanto isolados como em junção, o sal biliar TDCA e a pepsina adicionados à solução ácida não apresentaram aumento dos danos à integridade, como também o sal biliar GUDCA não preveniu a queda da RETE duodenal. E por fim, observou-se que os bioprotetores tópicos foram incapazes de prevenir a queda da RETE ocasionada pela solução ácida na mucosa duodenal.

Foi observado pelo presente estudo que a partir da exposição do epitélio duodenal a diferentes níveis de soluções ácidas, ocasionou-se diminuição na RETE de modo dependente da intensidade do aumento da acidez aplicadas às soluções. Esses achados não diferem do evidenciado na literatura, porém o mecanismo de sensibilidade à acidez ainda é desconhecido. Contudo, inúmeros estudos utilizando a acidez como agente lesivo já evidenciam o seu efeito sob a mucosa duodenal ocasionando diversos danos, tanto em dispépticos como saudáveis, onde pacientes dispépticos apresentam reação duodenal alterada à acidez com tempo de exposição aumentada no período pós-prandial, o que caracteriza agravamento dos sintomas (VANUYTSEL et al., 2010). Com base nisso, estudos *in vitro* mostram que biópsias de pacientes dispépticos possuem a RETE da mucosa duodenal significativamente menor do que indivíduos saudáveis (BEECKMANS et al., 2020) e evidenciam que, mesmo quando íntegras, biópsias de pacientes saudáveis após perfusões de soluções ácidas resultam em uma RETE mais baixa (cerca de 79%) (VANHEEL et al., 2020).

Ao se evidenciar a sensibilidade da RETE do epitélio duodenal à acidez, buscou-se compreender no presente estudo se o dano existente era

permanente, em que não foi observado prosseguimento dessa alteração após retirada do estímulo de solução ácida ao analisar a RETE duodenal durante o período de 1 hora. Com base nisso, até então inexistia na literatura evidências se o dano ocorrido por uma exposição a uma hiperacidez por períodos mais extensos se tornava permanente. Nesse ensaio, o epitélio duodenal foi exposto a uma solução de pH superácido (1,5) por um período de 30 minutos, sendo mais prolongado do que ele fisiologicamente lida ao receber o quimo advindo do estômago. No duodeno há fatores monitorados continuamente, que desencadeiam reflexos inibidores enterogástricos, sendo a acidez do quimo um dos principais. Esses reflexos inibidores enterogástricos, por serem sensíveis à presença de irritantes e ácidos, se ativam em tempos inferiores a 30 segundos neutralizando rapidamente o conteúdo ácido vindo do estômago. Quando ocorre a queda do pH do quimo para menos de 4 a 3,5, os reflexos bloqueiam inclusive a transferência adicional de conteúdos gástricos ácidos para o duodeno, até esse quimo ser neutralizado por meio das secreções pancreáticas e duodenais (GUYTON; HALL, 2017). Já nessa pesquisa o período analisado no presente estudo foi de uma exposição bem mais prolongada do que o duodeno lida fisiologicamente, mas mesmo assim não foi afetado.

Em estudos experimentais *in vitro*, envolvendo análise de exposições constantes e prolongadas ao HCl (10mM/pH 2) em células da mucosa gástrica íntegra, mostraram que durante essa submissão o pH intracelular fisiológico é mantido por meio da ação tampão de bicarbonato seroso, que assim se transporta para a superfície epitelial impedindo entradas de hidrogênios presentes no lúmen do epitélio da mucosa. Dessa forma, o bicarbonato em associação com a camada de gel do muco pré-epitelial aderente se mostram suficientes para manter o pH intracelular fisiológico (KIVILUOTO et al., 1990). Já em um estudo posterior, também com a finalidade de entender esse mecanismo de resistência da mucosa gástrica e duodenal, analisou-se a ação de transportadores de íons e fator de crescimento epidérmico (FCE), onde foi exposto que o FCE ocasiona aumento de células epiteliais gástricas como forma de defesa contra acidose intracelular no ácido luminal e que essa adição serosa de FCE aumenta concentração de cálcio intracelular. Durante a

exposição ao ácido luminal nas células epiteliais, evidenciou-se que ao ser inibido o regulador de pH intracelular dominante, o mecanismo dependente de regulação do pH ainda seguiu funcionando. Mostrando que além do cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, existe também outro mecanismo de defesa dependente de bicarbonato ainda indefinido que pode estar envolvido no processo de suporte ao dano pela acidez (NYLANDER-KOSKI, 2006). Mecanismos esses que podem vir a estarem envolvidos no processo de superação à exposição ácida encontrado no presente estudo.

Com intuito de compreender se o efeito do dano na barreira duodenal poderia ser envolvido com outros fatores além da acidez, já que a função de barreira prejudicada de acordo com a literatura é influenciada por fatores como a pepsina e os sais biliares. No presente estudo, se analisou o efeito de um potencial dano decorrente da exposição da mucosa duodenal a uma solução hiperácida (pH 1,5) adicionada de pepsina (1mg/ml), e assim, observou-se que a pepsina não alterou a resistência duodenal. No que concerne à função dessa protease ácida, evidências relatam que a pepsina pode ser transportada para dentro da célula, onde há estruturas com pH ácido, podendo causar danos intracelulares mesmo que o meio luminal contenha apenas pepsina inativa (JOHNSTON, et al., 2007b; BORSARO, 2017). A ausência de resultados pode ser justificada pelo fato de que essa pode vir a não ser um fator envolvido na lesão à mucosa.

Os dados obtidos na análise da associação entre a solução hiperácida e TDCA, relacionado ao dano na mucosa duodenal, denotaram ausência de agravamento na diminuição da RETE duodenal, já que a queda encontrada foi a mesma de quando a solução estava somente em meio ácido. A ausência de resultados não exclui a possibilidade de o TDCA ser um causador ou agravante de dano ao epitélio, tendo em vista que esse é um subproduto do DCA (ácido desoxicólico), decorrente da associação com taurina e se trata de um sal hidrofóbico. Nesse sentido, os sais biliares são citados por possuírem sua toxicidade associada à sua hidrofobicidade (ESTEVES et al., 2015) e, de acordo com a literatura, essa característica influencia na capacidade dos sais biliares de induzir dano a barreira do intestino delgado e aumentar à permeabilidade do intestino (BEECKMANS et al., 2020). Por ser o DCA um

ácido biliar hidrofóbico, a literatura evidencia sua atividade atrelada a efeitos apoptóticos nas membranas plasmáticas celulares, como: fluidização de bicamadas, redução da rigidez de membranas, flexão de bicamadas, ruptura de monocamadas e danos à membrana (ESTEVES et al., 2015).

Com intuito de compreender os níveis de sais biliares existentes no conteúdo duodenal em pacientes com DF, estudos clínicos evidenciaram em dispépticos concentrações diminuídas de sais biliares durante o jejum, sugerindo-se que, em decorrência dos estímulos inflamatórios, ocorre um aumento de bactérias que são responsáveis pela metabolização do sal biliar. Porém por mais que diminuídos os sais biliares totais, constatou-se uma redução em específico das concentrações dos sais biliares primários e um aumento dos sais secundários. Sendo os primários mais hidrofílicos, evidencia-se que essa desregulação deixa implicado que a natureza hidrofóbica do *pool* de sais secundários está ligada a condições patológicas. Em vista disso, encontrou-se também expressão aumentada de receptores de vitamina D (VDR), sendo quatro vezes mais expressos em dispépticos do que em saudáveis. O VDR é responsável pela regulação do metabolismo e síntese de sais biliares, estando envolvido na ação de sais biliares secundários, protegendo o TGI da toxicidade dos sais e preservando a homeostase da barreira da mucosa (NYLANDER et al., 1994). O que destaca a presença dos sais biliares hidrofóbicos no desenvolver e agravamento da DF.

Outros estudos ainda iniciantes encontraram registros de correlação positiva entre os sais biliares secundários e passagem paracelular, ocorrendo durante o pico de sal biliar em indivíduos dispépticos alimentados (BEECKMANS, 2020). Em outra análise, observando a quantidade de sais presentes como causas prováveis de defeitos de barreira, mostraram que as concentrações dessas substâncias foram semelhantes em dispépticos e saudáveis, mas que as proporções entre hidrofílicos e hidrofóbicos se alteram (VANHEEL, 2008). Dessa forma, essa presente pesquisa se trata de um estudo *in vitro* onde não havia estímulos patológicos ou mecanismos compensatórios para gerar o processo de desregulação entre sais, como ocorre *in vivo*, e assim como também se analisou o epitélio de camundongos saudáveis, com uma

arquitetura epitelial saudável e não sensibilizada por conta de uma patologia preexistente, o que pode vir a se justificar a ausência de efeitos do TDCA.

Pode-se hipotetizar que o TDCA possa vir a ser um elemento envolvido na diminuição da RETE quando o tecido já vem sendo prejudicado por outros mecanismos, como alterações nos receptores, como exemplo o VDR, e nas vias sinalização de sais biliares que podem desempenhar um papel crucial no desenvolver ou agravamento da DF (VANHEEL, 2008), não sendo esses mecanismos envolvidos no desenvolver do estudo, mas alvos necessários para estudos posteriores.

As análises obtidas ao se pesquisar o efeito entre a associação da solução superácida com TDCA e pepsina, também não apresentaram efeitos da potencialização da queda de RETE além da já evidenciada pela solução ácida como causadora. O que pode ser explicado pela ausência de estímulos fisiológicos citados que influenciam nas ações agressoras realizadas por essas substâncias (JOHNSTON, et al., 2007b; BORSARO, 2017; ESTEVES et al., 2015).

Quando adicionado o sal biliar GUDCA em meio a solução acidificada, observou-se a mesma ocorrência de queda de RETE que aconteceu sob efeito da aplicação da solução ácida de maneira isolada, sendo não encontrado um efeito protetor de resistência e não havendo efeito sob pH controle (7,4). O GUDCA é um subproduto do UDCA (ácido ursodeoxicólico), que se trata de um sal biliar que apresenta características divergentes do TDCA. Dados mostram que o UDCA tem como metabólito primário o LCA (ácido litocólico), um potente inibidor de respostas inflamatórias intestinais. Sendo hidrofílico, o UDCA apresenta efeitos anti-apoptóticos, anti-inflamatórios, terapêuticos, protetor contra toxicidade de citocinas e contra sais biliares citotóxicos (ESTEVES et al., 2015).

Na literatura se sugeriu que o UDCA e seus conjugados desempenham um papel na manutenção da integridade da barreira intestinal. Por conseguinte, um estudo in vitro analisou o efeito da administração do GUDCA sob a RETE de pacientes com DF, onde foi visto que o GUDCA aboliu as diferenças na

resistência da mucosa e na translocação bacteriana entre dispépticos e saudáveis (BEECKMANS, 2020). Inúmeros efeitos benéficos do UDCA são apresentados pelo fato de que foram analisados principalmente em modelos de doença orgânica, onde o UDCA foi associado ao reparo epitelial. Efeitos esses gastroprotetores não encontrados pelo presente estudo. A literatura retifica um estado marcadamente diferente do que se observa em um epitélio saudável ou dispéptico, portanto, neste contexto, as ações da UDCA podem diferir (GOLDEN et al., 2018). Valendo ressaltar que dados justificam a forma em que o UDCA pode afetar os tecidos diferencialmente, como em casos de DF, pela apresentação de um efeito de platô ou alterações nos receptores de ácidos biliares (BEECKMANS et al., 2020; KEELY, TALLEY, 2020).

Na DF, um dos fatores incluídos para melhoria dos sintomas são as mudanças nos hábitos de vida (dieta nutricional direcionada e descontinuação de agentes agressores) em associação com medicamentos que causam supressão ou neutralização do ácido produzido pelo estômago, que assim promovem alívio dos sintomas (VANDENBERGHE, 2020). A utilização desses fármacos possui certa limitação, no sentido de que os antiácidos são de ação rápida, necessitando muitas vezes de uso frequente e podendo se tornar ineficaz pelo desenvolvimento de tolerância ao uso (KAUNITZ, AKIBA, 2007).

Assim, com ênfase nas terapias medicamentosas, o presente estudo se propôs a investigar o efeito bioprotetor das gomas GA e GC, nas concentrações de 10%, e também comparar ao analisar a capacidade de proteção tópica dos fármacos já utilizados como terapia de primeira linha, Alginato e Sucralfato, aplicados topicamente na mucosa duodenal de camundongos. Em todos os compostos analisados, foi-se observado ineficácia na proteção do epitélio duodenal. Constantemente utilizados atrelados ao tratamento da DF, os fármacos alginato e sucralfato possuem como principais características a neutralização de ácido estomacal, estimulação da secreção de bicarbonato e formação de barreira (KWIATEK et al., 2011; SZABO, HOLLANDER, 1989).

A literatura demonstrou que o alginato, em órgãos adjacentes, apresentou efeito tópico protetor in vitro de biopsias expostas à solução ácida

(pH 2.0) em adição de pepsina e sais biliares (WOODLAND et al., 2013; WOODLAND et al., 2015). Entretanto, não se demonstrou efeito tópico do alginato quando em pHs hiperácidos (pH 1.0), podendo assim justificar a sua ausência de efeito, já que o pH analisado foi de 1,5.

Já o sucralfato, trata-se de um complexo de sulfato de alumínio e sacarose que demonstrou efeito de ligação à mucosa do esôfago, particularmente em áreas ulceradas (aderindo proteínas carregadas positivamente na base da úlcera). Pesquisas relatam inúmeras respostas positivas do sucralfato a afecções do TGI, como protegendo contra a posterior difusão de ácidos estomacais, pepsina e ácidos biliares (SZABO, 1991); em experimentos onde o sucralfato mostrou diminuir a atividade da pepsina in vivo, em ratos, humanos e na célula de difusão, protegendo o epitélio de atividade péptica por mais de 3 horas; e em experimentos in vitro, onde o sucralfato demonstrou adsorver os sais biliares e diminuir difusão ácida, com propriedades tampão de acidez. No entanto, o sucralfato é minimamente antiácido, o que justifica sua ineficiência ao agir prevenindo o dano de um pH superácido (BROGDEN et al., 1984).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Estudos em Fisiofarmacologia Gastrointestinal (LEFFAG), em busca por novos agentes terapêuticos, tem mostrado resultados positivos no uso de produtos naturais em patologias que acometem o TGI. Com base em estudos já realizados, a GC demonstrou efeitos positivos como: prevenção da queda de RETE quando aplicada a 5% em biópsias esofágicas desafiadas com soluções acidificadas, associado à pepsina e TDCA (DE LIMA et al., 2016); preveniu queda de RETE e aumento de permeabilidade em laringes de camundongos submetidas a soluções fracamente ácidas com ácidos biliares presentes (BORSARO, 2017); e demonstrou potencial efeito protetor em esôfago contra exposição a componentes de refluxato em modelo experimental e também pré-clínico testando GC (5% e 10%) (NICOLAU, 2018); O biopolímero da GA evidenciou também resultados otimistas em órgãos adjacentes como: potencial protetor na mucosa laríngea e esofágica de camundongos (CARMO NETO, 2020) e efeito protetor tópico in vitro de biópsias de pacientes de DRGE erosiva e não erosiva, quando submetidas à conteúdo ácido de pH 2,0 contendo pepsina e

TDCA (BINGANA, 2020). Porém, no presente estudo esse efeito não foi obtido.

Inúmeros são os aspectos que podem estar envolvidos na falta de obtenção de resultados semelhantes aos encontrados em outros órgãos onde se foi analisado a capacidade de proteção epitelial dos produtos naturais estudados em nosso grupo de pesquisa. Porém, como visto anteriormente, o duodeno possui em sua composição inúmeras células que são responsáveis por secretar glicoproteínas que lubrificam e umidificam a superfície da mucosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), o que assim se hipotetiza que possa ter dificultado no processo de bioadesividade dos produtos naturais analisados.

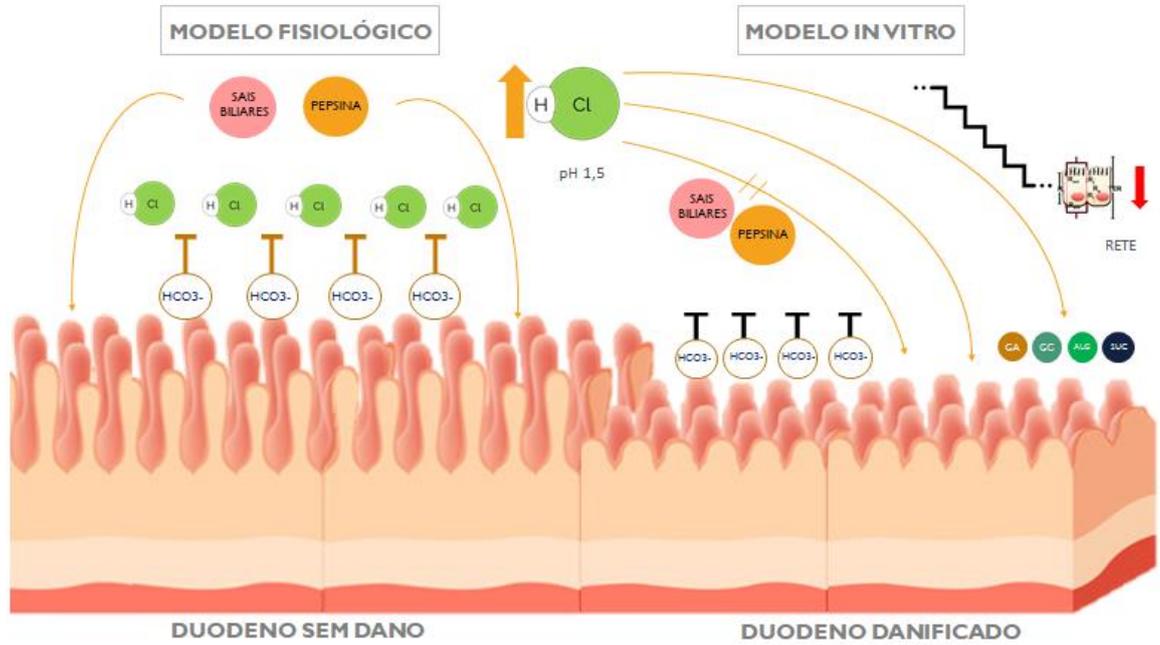
Diante disso, o presente estudo apresenta limitações no sentido de que se trata de um modelo *in vitro*, onde os resultados podem diferir devido diferentes tipos de tecido (*in vitro* vs. *in vivo*), por se limitar a uma análise somente de epitélio duodenal de camundongos saudáveis, inexistindo um parâmetro patológico para se tomar como base e não podendo também descartar um efeito iônico-dependente por meio da passagem analisada na RETE à medida em que ocorre a troca de soluções submetidas ao epitélio duodenal.

Com base nos tratamentos encontrados atualmente, escassos são os fármacos que venham a ser direcionados para intervir na barreira duodenal, a fim de promover proteção contra a exposição da acidez aumentada. Sendo a proteção do epitélio do duodeno de suma importância, no sentido de que ao ser protegida, pode vir a ser preservada a integridade da mucosa e até mesmo ocorrer a diminuição da manifestação dos sintomas em dispépticos. Dessa forma, faz-se necessário estudar substâncias com propriedades bioadesivas como opção terapêutica para o tratamento da DF.

7. CONCLUSÃO

Dado pelo exposto, é visto que há uma correlação dependente entre o aumento da acidez e a queda da integridade duodenal, mas que esse dano não é permanente quando exposto de forma prolongada, mesmo com a adição de TDCA e pepsina em junção à solução ácida, assim como também não houve promoção de melhorias na RETE ao se adicionar o GUDCA e ao se utilizar os biopolímeros tópicos como tratamento, GA e GC. Portanto sendo necessários estudos acerca de esclarecer a via da acidez nos danos relacionado ao epitélio duodenal e assim buscar por novos tratamentos direcionados para afecções duodenais relacionadas à DF.

Figura 11 - Modelo hipotético com base nos achados do estudo.



HCO_3^- - BICARBONATO ADVINDO DO PÂNCREAS.

// : AUSÊNCIA DE EFEITO

HCO_3^- : BICARBONATO ADVINDO DO MEIO INTRACELULAR.

↑ : AUMENTO DE EXPOSIÇÃO AO ÁCIDO - DANO NÃO PERMANENTE.

Fonte: autor da pesquisa.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. E., et al. Analysis of the antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Revista de Saúde Pública**, v.29, n.6, p.428–433, 1995.

ANDRIAMANANTOANINA, H.; RINAUDO, M. Relationship between the molecular structure of alginates and their gelation in acidic conditions. **Polymer International**, v.59, p.1531–1541, 2010a.

ANDRIAMANANTOANINA, H., & RINAUDO, M. Characterization of the alginates from five madagascan brown algae. **Carbohydrate Polymers**, v.82, p.555–560, 2010b.

BARBOZA, M. S., et al. Measurement of Intestinal Permeability Using Mannitol and Lactulose in Children with Diarrheal Diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 32, n. 12, p. 1499–1504, 1999.

BEECKMANS, D.; RIETHORST, D.; AUGUSTIJNS, P.; VANUYTSEL, T.; FARRÉ, R.; TACK, J.; VANHEEL, H. Altered duodenal bile salt concentration and receptor expression in functional dyspepsia. **United European Gastroenterology Journal**, 2018.

BEECKMANS, D.; FARRÉ, R.; RIETHORST, D.; KEITA, Á. V.; AUGUSTIJNS, P.; SÖDERHOLM, J. D.; VANUYTSEL, T.; VANHEEL, H. Relationship between bile salts, bacterial translocation, and duodenal mucosal integrity in functional dyspepsia. **Neurogastroenterology & Motility**, 2020.

BINGANA, R. D. **Proteção tópica in vitro da mucosa esofágica de pacientes com doença do refluxo gastroesofágico usando a “goma do angico”, um biopolímero de Anadenanthera colubrina**. 2020. 80 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina,

Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/56218>>. Acesso em: 03 março. 2018.

BONTEN, M. J. et al. Polysaccharide conjugate vaccine against pneumococcal pneumonia in adults. *New England Journal of Medicine*, v. 372, n. 12, p. 1114-1125, 2015.

BORSARO, Aline Almeida Figueiredo. **PERDA DA INTEGRIDADE MUCOSA LARÍNGEA IN VITRO INDUZIDA POR SOLUÇÃO ÁCIDA CONTENDO ÁCIDO BILIAR EM CAMUNDONGOS. EFEITO PROTETOR DA GOMA DE CAJUEIRO**. 2017. 91 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

CARMO NETO. J. P. **Biopolímero da goma do angico, obtido da casca da *Anadenanthera colubrina*, protege a mucosa laríngea e esofágica em modelo de refluxo gastresofágico em camundongo**. 2020. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/56182>>. Acesso em: 03 março. 2018.

CARVALHO, N.S.; SILVA, M.M.; Silva, R.O; NICOLAU, L.A.; SOUSA, F.B. Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Drug Dev. Res.**, n.76, p.143–151, 2015.

CITI, S., SABANAY, H., JAKES, R., GEIGER, B., & KENDRICK-JONES, J. Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. **Nature**, v.333, n.6170, p.272–276, 1988.

DE LIMA, F.B., NICOLAU L; WOODLAND P., LEE, C; SANTANA, A.P.M.; SILVA, D.; LEITE, J.R.; MELO, I.; SOUZA, M.A.N.; SANTOS, A.A.; SOUZA, M.H.; SIFRIM, D. Su1127 in vitro topical protection of human esophageal mucosal integrity by natural products from the northeast region of Brazil. **Gastroenterology**, v. 150, p. 477, 2016.

DE PAULA, R. C. M.; SANTANA, S. A.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of Albizia lebbeck gum exudates. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 44, p. 133-139, 2001.

DROSSMAN, D. A. Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features, and Rome IV. **Gastroenterology**, v. 150, n. 6, p.1262–1279.e2, 2016.

DROSSMAN, D. A. The Functional Gastrointestinal Disorders and the Rome III Process. **Gastroenterology**, v.130, n.5, p. 1377–1390, 2006..

EL-SERAG, H. B., & TALLEY, N. J. Health-related quality of life in functional dyspepsia. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.18, n.4, p.387–393, 2003.

ESTEVES, M.; FERREIRA, M. J.; KOZICA, A.; FERNANDES, A. C.; GONÇALVES S. A.; SARAMAGO, B. Interaction of Cytotoxic and Cytoprotective Bile Acids with Model Membranes: Influence of the Membrane Composition. **Langmuir**, v.31, n.32, p.8901–8910, 2015.

FARRÉ, R.; VAN MALENSTEIN H; DE VOS, R.; GEBOES, K.; VANDEN BERGHE, P.; FONARI, F.; BLONDEAU, K.; MERTENS, V.; TACK, J; SIFRIM, D. Short exposure of oesophageal mucosa to bile acids, both in acidic and weakly acidic conditions, can impair mucosal integrity and provoke dilated intercellular spaces. **Gut**, v. 57, p. 1366–1374, 2008.

FIGUEIREDO, A.A.; SANTANA, A.P.M.; NICOLAU, L.A.D.; BATISTA-LIMA, F.J.; WONG, D.V.T. et al. Topical protection of mice laryngeal mucosa using the natural product cashew gum. **Laryngoscope**. n.27, Oct, 2017.

FORD, A. C.; MAHADEVA, S.; CARBONE, M. F.; LACY, B. E.; TALLEY, N. J. *Functional dyspepsia*. **The Lancet**, v. 396, p. 1689-1702, 2020.

FURUSE, M.; FUJITA, K.; HIIRAGI, T.; FUJIMOTO, K., & TSUKITA, S. Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. **Journal of Cell Biology**, v.141, p.1539–1550, 1998.

FURUSE, M.; HIRASE, T.; ITOH, M.; NAGAFUCHI, A.; YONEMURA, S.; TSUKITA, S. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. **Journal of Cell Biology**, v.123, p.1777–1788, 1993.

GOMEZ, C. G.; PEREZ, M. V.; LOZANO, J. E.; RINAUDO, M.; VILLAR, M. A. Influence of the extraction-purification conditions on final properties of alginates obtained from brown algae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.44, p.365–371, 2009.

GROSCWITZ, K. R.; HOGAN, S. P. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 124, n. 1, p. 3-20, 2009.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Funções secretoras do tubo alimentar. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. Cap. 64, p. 617-631.

HAYCOX, A.; BAGUST, A.; WALLEY, T. Clinical guidelines---the hidden costs. **BOMJ**, v. 318, n. 7180, p.391–393, 1999.

HAYES, K. C. Nutritional problems in cats: taurine deficiency and vitamin A excess. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 23, p. 2-5, 1982.

HOLLANDER, D; TARNAWSKI, A. The protective and therapeutic mechanism of sucralfate. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.25, 173, p.1-5, 1990.

IKENOUCHI, Junichi; FURUSE, Mikio; FURUSE, Kyoko; SASAKI, Hiroyuki; TSUKITA, Sachiko; TSUKITA, Shoichiro. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. **Journal of Cell Biology**, v.171, p939–945, 2005.

ILLURI, R. et al. Anti-Inflammatory Activity of Polysaccharide Fraction of *Curcuma longa* Extract (NR-INF-02). **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v14, n.1, p.53-62, 2015.

JOHNSTON, N. et al. Pepsin and carbonic anhydrase isoenzyme III as diagnostic markers for laryngopharyngeal reflux disease. **Laryngoscope**, Hoboken, v. 114, p. 2129-2134, 2004.

JOHNSTON, N. et al. Activity/stability of human pepsin: implications for reflux attributed laryngeal disease. **Laryngoscope**, Hoboken, v. 117, p. 1036-1039, 2007a.

JOHNSTON, N. et al. Receptor-mediated uptake of pepsin by laryngeal epithelial cells. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.**, Thousand Oaks, v. 117, p. 1036-1039, 2007b.

JOHNSTON, N. et al. Pepsin promotes proliferation of laryngeal and pharyngeal epithelial cells. **Laryngoscope**, Hoboken, v. 122, p. 1317-1325, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Unter Berücksichtigung der Histophysiologie**. Springer-Verlag, 2013.

KAUNITZ, J. D.; AKIBA, Y. Review article: duodenal bicarbonate - mucosal protection, luminal chemosensing and acid-base balance. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.24, p.169–176, 2007.

KEELY, S.; TALLEY, N. J. Duodenal bile acids as determinants of intestinal mucosal homeostasis and disease. **Neurogastroenterology & Motility**, v.32, n.5, 2020.

KIVILUOTO, T.; PAIMELA, H.; MUSTONEN, H.; KIVILAAKSO, E. Intracellular pH in isolated Necturus antral mucosa exposed to luminal acid. **Gastroenterology**, v. 98, n.4, p.901–908, 1990.

KOMORI, K.; IHARA, E.; MINODA, Y.; OGINO, H., SASAKI, T.; FUJIWARA, M.; OGAWA, Y. The Altered Mucosal Barrier Function in the Duodenum Plays a Role in the Pathogenesis of Functional Dyspepsia. **Digestive Diseases and Sciences**, v.64, n.11, p.3228–3239, 2019.

KUMAR, A.; MOIN, A.; SHRUTHI, R.; AYAZ, A.; SHIVAKUMAR, H.G. Cashew Gum A Versatile Hydrophilic Polymer: **A Review. Current Drug Therapy**., n. 7,p. 2-12, 2012.

KWIATEK, M.A.; ROMAN S; FAREEDUDDIN A; PANDOLFINO, J.E.; KAHNILAS P,J. An alginate-antacid formulation (Gaviscon Double Action Liquid) can eliminate or displace the postprandial 'acid pocket' in symptomatic GERD patients. **Aliment Pharmacol Ther**, V.34, 59–66, 2011

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n.1, p.106–126, 2012.

LEITE, A.J.; COSTA, R.R.; COSTA, A.M.S.; MACIEL, J.S.; COSTA, J.F.G.et al. The potential of cashew gum functionalization as building blocks for layer-by-layer films. **Carbohydr Polym**. n.15, v. 174, p.849-857, Oct, 2017.

LIEBERMAN, M.; MARKS, A. D. **Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach**. 4 ed. Philadelphia: Wolter Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

LIMA, R.S.N.; LIMA, J. R.; SALIS, C. R.; MOREIRA, R.A. Cashew-tree (*Anacardium occidentale* L.) exudate gum: a novel bioligand tool. **Biotechnol Appl Biochem.**, n. 35, (Pt 1), p.45-53, Fev, 2002.

MAHADEVA, S.; GOH, K. Epidemiology of functional dyspepsia: A global perspective. **World Journal of Gastroenterology**, v.12, n. 17, p. 2661, 2006.

MARTÌN-PADURA, I. et al. Junctional Adhesion Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily That Distributes at Intercellular Junctions and Modulates Monocyte Transmigration. **The Journal of Cell Biology**, v.142, n.1, p.117–127, 1998.

MATHEUS, Valquiria Aparecida. **Efeito do butirato de sódio sobre os parâmetros metabólicos e a barreira epitelial intestinal de animais pré-**

diabéticos. 2016. 64f. Dissertação (Biologia Celular e Estrutural, com ênfase em Biologia Tecidual) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2016.

MCDONALD, P. et al. **Animal nutrition**. 7 ed. Pearson Canada, 2010. 712 p.

McQUAID, K. R. et al. Systematic review: the role of bile acids in the pathogenesis of gastro-oesophageal reflux disease and related neoplasia. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.34, n.2, p.146–165, 2011

MOAYYEDI, P.; MASON, J. Clinical and economic consequences of dyspepsia in the community. **Gut**, n. 50, v. 4, p. iv10–iv12, 2002.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F.; AGUR, A. M. R. **Anatomia orientada para a clínica**. 7ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2014.

MOREIRA, B.R.; BATISTA, K.A.; CASTRO, E.G.; LIMA E.M.; FERNANDES, K. F. A bioactive film based on cashew gum polysaccharide for wound dressing applications. **Carbohydr Polym**. n.20, p. 122:69-76, May, 2015.

MORETÃO, M. P.; BUCHI, D. F.; GORIN, P A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**, v.89, n.2-3, p.175–185, 2003.

NELSON, R. W.; COUTO, G. C. **Medicina interna de pequenos animais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1324 p, 2006.

NICOLAU, L. A. D. **Efeito esofagoprotetor de um biopolímero, a goma do cajueiro, na doença do refluxo não-erosiva em murinos e em biópsias esofágicas humanas: perfil anti-inflamatório e efeito tópico.** 2018. 117 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/29302>>. Acesso em: 22 março. 2022.

NYLANDER, O.; HOLM, L.; WILANDER, E.; HÄLLGREN, A. Exposure of the duodenum to high concentrations of hydrochloric acid. Effects on mucosal permeability, alkaline secretion, and blood flow. **Scand J Gastroenterol**, v.29, n.5, p.437-44, 1994.

NYLANDER-KOSKI, O.; MUSTONEN, H.; PUOLAKKAINEN, P.; KIVILUOTO, T.; KIVILAAKSO, E. Epidermal Growth Factor Enhances Intracellular pH Regulation via Calcium Signaling in Acid-Exposed Primary Cultured Rabbit Gastric Epithelial Cells. **Digestive Diseases and Sciences**, v.51, n.8, p.1322–1330, 2006.

PARDON, N. A.; VICARIO, M.; VANHEEL, H.; VANUYTSEL, T.; CEULEMANS, L. J.; VIETH, M.; JIMENEZ, M.; TACK, J.; FARRÉ, R. A weakly acidic solution containing deoxycholic acid induces esophageal epithelial apoptosis and impairs integrity in an in vivo perfusion rabbit model. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.310, n.7, p.G487–G496, 2016.

PESSOA, W. S. et al. Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) in cutaneous wound healing in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.27, n.10, p.655–670, 2013.

PETEIRO, C. et al. Alginate production from marine macroalgae, with emphasis on kelp farming. In **Springer Series in Biomaterials Science and Engineering**, p. 27–66, 2017.

PODOLSKY, Daniel K. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.277, n.3, p.495–499, 1999.

RODRIGUES, S. S.; MENIN, E. Anatomia do tubo digestivo de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae, Salmininae). **Biotemas**, v. 21, n. 2, p. 65-75, 2008.

ROHOF, W.O.; BENNINK, R.J.; SMOUT, A.J.; THOMAS, E.; BOECKXSTAENS, G.E. An alginate-antacid formulation localizes to the acid pocket to reduce acid reflux in patients with gastroesophageal reflux disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n.12, p.1585–1591, 2013.

SAHAN, H. E. et al. Comparison of functional dyspepsia with organic dyspepsia in terms of attachment patterns. **Comprehensive Psychiatry**, v.83, p.12–18, 2018.

SALEHI, E.; DARAEI, P.; ARABI SHAMSABADI, A. A review on chitosan-based adsorptive membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 419–432, 2016.

SALES, T. M. A. L. **Integridade da mucosa esofágica na doença do refluxo gastroesofágico: proteção do polisacarídeo sulfatado da gracilaria caudata**. 2018. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2018. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/30986>>. Acesso em: 25 março. 2022.

SAMUELSON, D. A. **Tratado de histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 527 p.

SANCHEZ-BALLESTER, N. M.; BATAILLE, B.; SOULAIROL, I. Sodium alginate and alginic acid as pharmaceutical excipients for tablet formulation: Structure-function relationship. **Carbohydrate Polymers**, v.270, 2021.

SANTOS, J. S.; MARINHO, R. R.; EKUNDI-VALENTIM, E.; RODRIGUES, L.; YAMAMOTO, M. H.; TEIXEIRA, S. A.; THOMAZZI, S. M. et al. Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v.148, n. 1, p.218–222, 2013.

SEIDLER, U.; LENZEN, H.; CINAR, A.; TESSEMA, T.; BLEICH, A.; RIEDERER, B. Molecular Mechanisms of Disturbed Electrolyte Transport in Intestinal Inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1072, n.1, p.262–275, 2006.

SHEN, L.; WEBER, C. R.; RALEIGH, D. R.; YU, D.; TURNER, J. R. Tight Junction Pore and Leak Pathways: A Dynamic Duo. **Annual Review of Physiology**, v.73, n.1, p.283–309, 2011.

SILVA, A. G.; RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M. Composição e propriedades reológicas da goma do Angico (*Anadenanthera Macrocarpa* Benth). **Polímeros**, v. 8, p. 34–40, 1998.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. Artmed editora, 2010.

SIMPSON; CAMPBELL, et al. Aflibercept, Bevacizumab, or Ranibizumab for Diabetic Macular Edema. **New England Journal of Medicine**, v.372, n.13, p.1193–1203, 2015.

SOUZA FILHO, M.D. et al. Orabase formulation with cashew gum polysaccharide decreases inflammatory and bone loss hallmarks in experimental periodontitis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, n. 28, p. 1093-1101, 2018.

STANGHELLINI, V.; CHAN, F. K. L.; HASLER, W. L.; MALAGELADA, J. R.; SUZUKI, H.; TACK, J.; TALLEY, N. J. Gastroduodenal disorders. **Gastroenterology**, v. 150, n.6, p. 1380-1392, 2016.

SUZUKI, T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. **Animal Science Journal**, v. 91, n.1, fev. 2020.

SZABO, S.; HOLLANDER, D. Pathways of gastrointestinal protection and repair: Mechanisms of action of sucralfate. **The American Journal of Medicine**, v.86, n. 6, p.23–31, 1989.

TALLEY, N. J.; LACKE III, G. R.; LAHR, B. D.; ZINSMEISTER, A. R.; TOUGAS, G.; LIGOZIO, G.; ROJAVIN, M. A.; TACK, J. Functional dyspepsia, delayed gastric emptying, and impaired quality of life. **Gut**. v. 55, p. 933–939, 2006.

THEISEN, J. et al. Suppression of gastric acid secretion in patients with gastroesophageal reflux disease results in gastric bacterial overgrowth and deconjugation of bile acids. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v.4, n.1, p.50–54, 2000.

VANDENBERGHE, A.; SCHOL, J.; VAN DEN HOUTE, K., MASUY, I.; CARBONE, F.; TACK, J. Current and emerging therapeutic options for the management of functional dyspepsia. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, p1–12, 2020.

VANHEEL, H.; VICARIO, M.; BEECKMANS, D.; COCCA, S.; WAUTERS, L.; ACCARIE, A.; VANUYTSEL, T. Duodenal acidification induces gastric relaxation and alters epithelial barrier function by a mast cell independent mechanism. **Scientific Reports**, v. 10, n.1, 2020.

VANHEEL, H.; VICARIO, M.; VANUYTSEL, T.; OUDENHOVE, L. V.; MARTINEZ, C.; KEITA, Å. V.; PARDON, N.; SANTOS, J.; SÖDERHOLM, J. D.; TACK, J.; FARRÉ, R. Impaired duodenal mucosal integrity and low-grade inflammation in functional dyspepsia. **Gut**, v.63, n.2, p.262–271, 2013.

VANUYTSEL, T.; KARAMANOLIS, G.; OUDENHOVE, L. V.; VOS, R.; TACK, J. Influence of ondansetron on gastric sensorimotor responses to short duodenal acid infusion in healthy volunteers. **Neurogastroenterology & Motility**, v.23, n.3, p.226–e115, 2010.

VAUCHEL, P.; LEROUX, K.; KAAS, R.; ARHALIASS, A.; BARON, R.; LEGRAND, J. Kinetics modeling of alginate alkaline extraction from *Laminaria digitata*. **Bioresource Technology**, v.100, n.3, p.1291–1296, 2009.

WALKER, M. M.; TALLEY, N. J. The Role of Duodenal Inflammation in Functional Dyspepsia. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.51, n.1, p.12–18, 2017.

WAUTERS, L.; TALLEY, N. J.; WALKER, M. M.; TACK, J.; VANUYTSEL, T.

Novel concepts in the pathophysiology and treatment of functional dyspepsia. **Gut**, v. 69, n. 3, p. 591-600, nov. 2019.

WIJESEKARA, I. et al. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydr. Polym.**, v. 84, p. 14-21, 2011.

WOODLAND, P.; BATISTA-LIMA, F. LEE, C.; PRESTON, S.L.; DETTMAR, P.; SIFRIM, D. Topical protection of human esophageal mucosal integrity. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, n. 15, v. 308(12), p.G975-80, jun, 2015.

WOODLAND, P.; LEE, C.; DURAISAMY, Y.; FARRE, R.; DETTMAR, P. et al. Assessment and protection of esophageal mucosal integrity in patients with heartburn without esophagitis. **Am J Gastroenterol.**, n.108, p.535–543, 2013.

YAMASSAKI, F.T.; LENZI, R.M.; CAMPESTRINI, L.H.; BOVO, F.; SEYFRIED, M. et al. Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. **Carbohydr Polym.** n. 10, p. 125:241-8. Jul, 2015.

ANEXOS

Anexo 1 - Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DE TRATAMENTOS TÓPICOS NA INTEGRIDADE DUODENAL DE CAMUNDONGOS", protocolada sob o CEUA nº 1444050421 (00 001902), sob a responsabilidade de **Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza** e equipe; **Maria Klayre Araújo de Sousa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 15/06/2021.

We certify that the proposal "EFFECT OF TOPICAL TREATMENTS ON THE DUODENAL INTEGRITY OF MICES", utilizing 96 Heterogenics mice (96 males), protocol number CEUA 1444050421 (00 001902), under the responsibility of **Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza** and team; **Maria Klayre Araújo de Sousa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 06/15/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2021 a 11/2021**

Área: **Departamento de Medicina Clínica**

Origem: **Biotério Central da UFC**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 3 meses**

N: **96**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **20 a 30 g**

Local do experimento: Todos os procedimentos experimentais serão realizados no Laboratório de Estudos da Fisiologia Gastrointestinal (LEFFAG).

Fortaleza, 30 de janeiro de 2022

Prof. Dra. Camilla Ferreira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará